

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA EKOLOGIE



Vplyv disperzie a lokálnych procesov na genetickú diverzitu populácií *Daphnia curvirostris* a *Daphnia pulex* v kontexte regionálnej štruktúry riečnej siete

Effects of dispersal and local processes on genetic structure of populations Daphnia curvirostris and Daphnia pulex: genetic variability within and among river flood-plains

Diplomová práca

Marek Repovský

Praha, august 2008

Školiteľ: RNDr. Martin Černý, PhD

PodĎakovanie

Na začiatok by som chcel poďakovať Grantovej agentúre Českej republiky za grant GA ČR DIV/06/E007 a MŠM VZ 0021620828 za finančnú podporu, bez ktorej by táto práca mohla len ťažko vzniknúť.

Ďalej by som chcel poďakovať svojmu školiteľovi, RNDr. Martinovi Černému PhD, za vedenie mojej diplomovej práce, za podporu pri odberoch vzoriek a za uvedenie do práce v laboratóriu. Potom RNDr. Adamovi Petruskovi PhD za pomoc pri analýze DNA, Petrovi Kálnaiovi za cenné pripomienky a konzultácie a všetkým, ktorí akokoľvek prispeli ku vzniku tejto práce.

Na záver by som chcel poďakovať svojim rodičom, ktorí ma vždy plne podporovali a počas celého štúdia pre mňa mali vždy pochopenie.

Prehlasujem, že táto práca bola vypracovaná samostatne, s použitím uvedenej literatúry a iných citovaných zdrojov. Povoľujem k jej zapožičaniu s podmienkou, že všetky informácie budú riadne citované.

V Prahe dňa 30.8.2008

Bc. Marek Repovský

Abstract

Only a few studies have compared patterns of genetic variation among populations of different *Daphnia* species in the case of natural systems of river catchments. We assumed that as a result of dendritic nature of rivers and streams, the most genetic differentiation should be found between populations from different catchments and the least should be in the same sub-catchment. This is because it is much easier for animals restricted to passive dispersal via stream channel to disperse between adjacent streams in the same sub-catchment than between catchments. Using allozyme data based on six polymorphic enzyme loci, we present an analysis of genetic differentiation among 45 *Daphnia curvirostris* and 39 *Daphnia pulex* populations, separated by less than 100 m to more than 500 km from each other. The genetic population structure of the two species was strikingly similar, consistent with their similar metapopulation ecology. The mean F_{ST} value (differentiation within populations) was 0.32 and 0.30 and a hierarchical analysis showed that most genetic differentiation was between populations (68 and 70 %), less was present among populations within catchments (26 and 19 %) and the least was present among whole catchments (6 and 11 %). In spite of the large range of geographic distances, there was only a slight tendency for an increase in genetic differentiation with increasing geographic distance between populations, but the relation was not significant. This was mainly due to the fact that neighbouring populations were already highly genetically differentiated. This can be a consequence of lasting founder effect and local adaptations that act in the temporary habitats in which *D. curvirostris* and *D. pulex* occur. This largely determine their levels of genetic diversity, and therefore blur the expected relationship between genetic diversity and geographical distance or classification to a particular catchment.

Obsah

Pod'akovanie.....	2
Abstract	3
Obsah	4
Úvod.....	5
Literárny prehľad	7
Všeobecné informácie.....	7
Genetická štruktúra metapopulácií druhov <i>Daphnia curvirostris</i> a <i>D. pulex</i>	8
Faktory ovplyvňujúce genetickú diverzitu medzi populáciami	9
Materiál a metódy	14
Úvod.....	14
Lokality	14
Odber a spracovanie vzoriek	18
Elektroforéza alozýmov	18
Analýzy dát	19
Výsledky	22
Enzýmová variabilita	22
Genetická variabilita v rámci populácií	23
Hardy-Weinbergova rovnováha a rozmnožovací systém	24
Genetická diferenciácia medzi populáciami	25
Závislosť medzi genetickou a geografickou vzdialenosťou	31
Diskusia.....	34
Enzýmová variabilita	34
Genetická variabilita v rámci populácií	36
Hardy-Weinbergova rovnováha a rozmnožovací systém	37
Genetická diferenciácia medzi populáciami	39
Závislosť medzi genetickou a geografickou vzdialenosťou	43
Analýza DNA	47
Lokality	47
Izolácia DNA.....	49
Amplifikácia génu COI.....	49
Amplifikácia génu 12S srRNA.....	50
Amplifikácia génu NADH-2 (ND2)	50
Spracovanie sekvencií DNA	51
Výsledky a diskusia	51
Gén pre COI	51
Gén pre 12S srRNA	53
Gén pre NADH-2 (ND2).....	54
Záver.....	57
Literatúra	58
Prílohy	65

Úvod

Táto diplomová práca je súčasťou medzinárodného projektu Eurocores/EuroDiversity s názvom “Connectivity, dispersal and priority effects as drivers of **biodiversity** and ecosystem function in pond and **pool** communities (BIOPOOL),“ ktorého česká účasť bola financovaná z grantu GA ČR DIV/06/E007.

Projekt BIOPOOL využíva malé vodné plochy ako modelové systémy pre výskum biodiverzity a na nich sa snaží testovať hypotézy o vplyve konektivity, disperzie organizmov a kolonizácie na spoločenstvá a fungovanie ekosystémov. Za cieľ si dal charakterizovať relatívny význam migrácie (regionálny proces) v kontraste k významu lokálnych procesov, ktoré určujú zloženie a rozmanitosť lokálnych spoločenstiev. Ďalej chce charakterizovať význam historických vplyvov (efekt priority sprostredkovaný existujúcou bankou propagulí) a kvantifikovať efekt diverzity (ako vnútro-, tak aj medzidruhovej) na funkciu ekosystému so zvláštnym zreteľom na efektivitu využívania zdrojov spoločenstvom a na odolnosť voči disturbanciám (vrátane introdukcií nepôvodných druhov).

Moja časť projektu je celkom samostatná a zaoberá sa vplyvom disperzie a lokálnych procesov na genetickú diverzitu populácií dvoch druhov dafnií - *Daphnia curvirostris* a *Daphnia pulex* v kontexte regionálnej štruktúry riečnej siete. Oba druhy sú typickými obyvateľmi malých periodických vodných plôch, zachovaných do dnešnej doby hlavne v poriečnych oblastiach väčších nívnych riek. Tieto lokality predstavujú pomerne nestály biotop s premenlivými fyzikálnymi a chemickými podmienkami a s pomerne rýchlym vývojom vzniku a zániku. Z pohľadu metapopulačnej ekológie tak predstavuje každá lokalita metapopuláciu, ktorá môže byť migráciou prepojená s inými. Hoci majú lokálne populácie pomerne krátku životnosť, metapopulácia ako celok prežíva dlho. Preto organizmy, ktoré sa tu vyskytujú, sú dobre prispôbené na prežívanie nepriaznivých podmienok a šírenie sa na nové lokality. K tomuto účelu vytvárajú trvalé vajíčka, štádiá odolné voči vyschnutiu a nízkym teplotám a predstavujúce zároveň hlavné médium pasívnej disperzie. Disperzia u perloočiek je pomerne dobre preskúmaná a všeobecne sú perloočky považované za veľmi dobrých kolonizátorov. Navyše vďaka partenogenetickému množeniu stačí na založenie novej populácie jeden jedinec (propagula), čo má potom vplyv na genetickú štruktúru takto založenej populácie. Disperzia trvalých vajíčok je pasívna, sprostredkovaná pomocou nejakého vektora. Ako vektor sa uplatňuje hlavne tečúca voda (Michels et al., 2001a,b; Cottenie et al., 2003), migrujúce vodné vtáky (Figuerola & Green, 2002; Charalambidou & Santamría, 2002; Green & Figuerola, 2005), divé, domáce zvieratá a človek

(Havel & Shurin, 2004) a na krátke vzdialenosti vo vhodných podmienkach aj vietor (Cáceres & Soluk, 2002; Brendonck & Riddoch, 1999). Celú problematiku podrobne popisujúcu rôzne druhy disperzie u sladkovodných bezstavovcov výborne zhrnuli Bilton et al. (2001).

Hlavným cieľom tejto práce je pomocou molekulárnych markerov charakterizovať rozsah pasívnej disperzie vodou medzi populáciami a na jeho základe testovať túto hypotézu: Ak sú perloočky naozaj dobrými kolonizátormi, potom by mali populácie medzi sebou vykazovať nízku mieru genetickej variability. To by sa u oboch druhov, ktoré sa vyskytujú v dočasných periodických vodách v riečnych nivách, malo prejavovať hlavne v rámci súvislých riečnych systémov, kde sa dá predpokladať, že minimálne v období záplav tieto lokality spolu komunikujú. Dajú sa tak očakávať väčšie rozdiely medzi riečnymi systémami než v rámci riečnych systémov, no aké však v skutočnosti budú, je predmetom tohto navrhnutého projektu. Ďalším cieľom a prostriedkom na overenie našej hypotézy je pomocou molekulárnych markerov charakterizovať vnútropopulačnú a medzipopulačnú genetickú variabilitu jednotlivých populácií druhu *D. curvirostris* a *D. pulex* a zistiť, ktoré procesy sa podieľajú na tvorbe genetickej diverzity lokálnych populácií.

Pre splnenie cieľov tejto práce boli použité dva druhy molekulárnych markerov – analýza alozýmův a analýza DNA. Alozýmovou analýzou sa zaoberajú kapitoly Metodika, Výsledky a Diskusia. Analýza variability na vybraných úsekoch DNA je pojednávaná samostatne v kapitolách Analýza DNA a Výsledky a diskusia.

Hoci je moja časť projektu celkom samostatná, projekt tesne súvisí s ďalšími navrhnutými a čiastočne realizovanými témami, zameranými na tú istú hypotézu, avšak s použitím iného typu organizmu (veľké Brachiopoda periodických vôd – žiabronôžky a listonožky, komáre r. *Mochlonix* a žížavica vodná (*Asellus aquaticus*)).

Literárny prehľad

Všeobecné informácie

Daphnia curvirostris Eylman, 1887 (Crustacea, Branchiopoda, Cladocera, Daphniidae) je druh planktonickej perloočky, ktorej rozšírenie zahŕňa celú Palearktídu a východnú časť Afriky (Ishida et al., 2006). Vyskytuje sa typicky v dočasných i trvalých kalužiach, rybníkoch a v litorále malých nádrží v miernom, v arktickom pásme a v horskom regióne (Benzie, 2005). V centrálnej Európe sa typicky vyskytuje hlavne v dočasných periodických vodách na piesčitých pôdach v opadavých lesoch v údoliach väčších riek (Hrbáček, 1987). Tieto lokality sú často zarastené príbrežnou vegetáciou, ktorá znižuje kolísanie vonkajších podmienok, napríklad zatienením hladiny znižuje intenzitu dopadajúceho slnečného žiarenia a zabraňuje tak prílišnému kolísaniu teploty, ale pôsobí aj ako určitá veterná bariéra a môže tak znižovať pasívnu disperziu pomocou vetra ako vektora. V južnej Európe (Bulharsko) ju môžeme nájsť aj v rybníkoch, kde v našich podmienkach prevažuje *D. pulicaria* (Hrbáček, 1987). Michels et al. (2003) charakterizujú výskyt tejto dafnie v Belgicku v rybníkoch s pomerne vysokou hodnotou vodivosti ($1,36\text{--}2,3\text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), situovaných blízko pobrežia, ďalej v zátokách s brakickou vodou, v malých habitatoch náchylných k vysychaniu a vo vysoko eutrofných rybníkoch zaťažených odpadovou vodou z domácností.

Rozmnožuje sa podobne ako väčšina perloočiek pomocou cyklickej partenogenézy. Klasický reprodukčný cyklus a jeho dôsledky na genetickú štruktúru popisujú napríklad (Hebert, 1987; Mort, 1991; De Meester, 1996). Veľkosť samičiek kolísá v rozmedzí 1,3–2,9 mm a samcov 0,7–1,1 mm. Podrobnejšie informácie o výskyte v rôznych častiach sveta a morfológických charakteristikách tohto druhu podávajú (Hrbáček, 1987; Benzie, 2005; Ishida et al., 2006).

Daphnia curvirostris kombinuje charakteristiky tradičnej skupiny *longispina* (tvar rostra, krátke netrubicovité antény u samičiek a počet chromozómov $2n=20$) a skupiny *pulex* (väčšie koreňové hrebienky na koncových drápkoch postabdomenu, polygonálne políčkovanie medzi naupliovým očkom a brušným okrajom rypca a tvar antén u samcov), ale nie je to hybrid týchto dvoch skupín (Hrbáček, 1959). Japonská *D. curvirostris*, ktorá vykazovala morfológické odlišnosti od európskej a mala aj iný počet chromozómov ($2n=22$), bola po dodatočných genetických a morfológických analýzach opísaná ako nový druh *Daphnia tanakai* sp. nov (Ishida et al., 2006).

Molekulárne genetické analýzy ukázali, že druh patrí skôr do skupiny *longispina* ako do skupiny *pulex* (Colbourne & Hebert, 1996; Schwenk et al., 2000), a alozýmové dáta ukázali, že populácie z Kanady a z Českej a Slovenskej republiky sú si podobné - zdieľajú niektoré alely charakteristické pre tento druh (Černý & Hebert, 1999).

Daphnia pulex Leydig, 1860 je druh planktonickej perloočky podobnej veľkosti ako *D. curvirostris* a vyskytujú sa aj v niektorých podobných typoch habitatov – v dočasných i trvalých vodách a menších jazerách, kde počas dňa prebýva v hlbších častiach a v noci vystupuje k hladine (Benzie, 2005). Ďalej ju nájdeme ako v otvorených, tak aj v polootvorených či úplne zatienených rybníkoch (Michels et al., 2003). Všeobecne je tento druh považovaný za eurytopný, široko rozšírený v celom Holarktickom regióne, zatiaľ čo *D. curvirostris* je považovaná za habitatového špecialistu (Hebert, 1995). Podrobnejšie informácie o výskyte v rôznych častiach sveta a o morfológických charakteristikách tohto druhu podávajú (Hrbáček, 1987; Benzie, 2005). Je známe, že v Severnej Amerike vykazuje tento druh variabilitu v rozmnožovacom systéme. Rozmnožuje sa cyklickou alebo obligátnou partenogenezou, v závislosti na zemepisnej šírke (Innes et al., 1986; Hebert et al., 1993). Podobne aj v Európe sa tento druh rozmnožuje ako cyklickou partenogenezou (Ward & Geissler, 1988; Ward et al., 1994), tak aj obligátnou partenogenezou, hlavne na severe Škandinávie (Ward et al., 1994).

Oba druhy sa medzi sebou líšia morfológicky (Hrbáček, 1987; Benzie, 2005) aj geneticky (Černý, 1995; Colbourne & Hebert, 1996; Schwenk et al., 2000).

Vďaka svojej krátkej generačnej dobe, rýchlemu populačnému rastu, malej veľkosti a ľahkému chovu v kultúrach si perloočky vydobyli svoje miesto ako modelový organizmus nielen pre štúdium fylogenie a systematiky, ekologickej genetiky, zoogeografie, ale aj populačnej dynamiky a životných histórií, príjmu potravy, rastu a reprodukcie, vzťahu predátor - korisť, chemickej komunikácie, správaniu a pod. (Larsson & Weider, 1995) .

Genetická štruktúra metapopulácií druhov *Daphnia curvirostris* a *D. pulex*

Vnútrozemské vody, často izolované od seba, predstavujú vynikajúci príklad ostrovných lokalít. Sú od seba vzájomne oddelené a v priestore sú rozmiestnené nepravidelne, preto z hľadiska klasickej metapopulačnej teórie ich môžeme chápať ako ostrovčeky vody v mori suchej zeme. Extrémna izolácia býva v dočasných kalužiach, roztrúsených v semiaridnom prostredí, ale tiež v potokoch a riekach patriacich k rôznym povodiam. K úspešnému prežívaniu na týchto lokalitách sa museli organizmy adaptovať rozličným spôsobom. Musia sa napríklad veľmi úspešne šíriť aj na veľké vzdialenosti, lebo sladkovodné biotopy sú od seba vzájomne oddelené a navyše značne premenlivé (rýchlo vznikajú a zanikajú). Takže tie organizmy, ktoré neboli schopné šírenia, v nich už nežijú. Preto nájdeme skoro vo všetkých týchto lokalitách danej oblasti rovnaké druhy a to už veľmi skoro po ich vzniku (Dieckmann & O'Hara, 1999).

Ďalšou adaptáciou na tieto extrémne biotopy je rýchle množenie a prispôsobovanie sa lokálnym podmienkam. K tomu slúži partenogenetické rozmnožovanie, vďaka ktorému stačí na založenie novej populácie len jeden jedinec a za vhodných podmienok dochádza aj k rýchlemu klonálnemu rozmnožovaniu a monopolizácii zdrojov (Boileau et al., 1992; De Meester et al., 2002). Adaptácia na lokálne podmienky zvyčajne nasleduje po kolonizácii nových habitatov a môže mať vplyv na genetickú diverzitu medzi jednotlivými lokalitami (De Meester, 1996; De Meester et al., 2002).

Genetická štruktúra populácií obyvateľov týchto biotopov je určená rozsahom genetického toku medzi jednotlivými ostrovčekmi a procesmi vyplývajúcimi zo životného cyklu a z adaptácií na tento nestály a vysoko premenlivý biotop.

Faktory ovplyvňujúce genetickú diverzitu medzi populáciami

Všeobecne môžeme faktory vplyvajúce na genetickú diverzitu medzi populáciami rozdeliť na dve skupiny:

1. faktory zvyšujúce genetickú diverzitu
2. faktory znižujúce genetickú diverzitu

Faktory zvyšujúce genetickú diverzitu medzi populáciami:

Veľkosť populácie. Na veľkosti populácie závisia náhodné zmeny vo frekvenciách aliel: čím je populácia menšia, tým je aj pravdepodobnosť zmeny vo frekvenciách aliel väčšia (Lowe et al., 2004). Tieto náhodné procesy v zmene zastúpenia aliel sú dôsledkom náhodného párovania gamiet a označujeme ich pojmom **genetický drift**. V extrémnom prípade môže dôjsť k fixovaniu jedinej alely a vymiznutiu polymorfizmu v populácii. Pravdepodobnosť fixovania danej alely závisí na frekvencii výskytu tejto alely v populácii (Lowe et al., 2004). Aby populácia odolala vymiznutiu polymorfizmu, musí byť dostatočne veľká. Genetický drift sa viac prejavuje pri nižších populačných početnostiach, napríklad pri kolonizácii nových lokalít malou skupinou jedincov (efekt zakladateľa), alebo pri fragmentácii biotopov, keď je široko rozšírená populácia redukovaná na menšie (bottleneck - efekt hrdla fľaše). Jedným z možných dôsledkov efektu zakladateľa alebo efektu hrdla fľaše môže byť prípad, že novo vytvorená populácia alebo fragment môžu mať rozdielne zastúpenie aliel ako zdrojová alebo pôvodná populácia (Lowe et al., 2004; Louette et al., 2007).

Reprodukčný systém. U rodu *Daphnia* je známe, že sa jedinci môžu rozmnožovať cyklickou alebo obligátnou partenogenezou. Populácie s cyklickou partenogenezou majú vo svojom

životnom cykle ako fázu klonálnej partenogenetickej reprodukcie, tak aj fázu sexuálnu, pri ktorej vznikajú trvalé vajíčka. Populácie s cyklickou partenogenezou zvyčajne vykazujú len malé odchýlky od Hardy-Weinbergovej (H-W) rovnováhy na lokus a veľký počet genotypov (Innes et al., 1986; Lynch & Spitze, 1994; De Meester, 1996). Oproti tomu obligátne asexuálne populácie nemajú vo svojom životnom cykle sexuálnu fázu, vykazujú odchýlky od H-W rovnováhy (zvyčajne majú nadmernú alebo fixovanú heterozygotnosť na niekoľkých lokusoch) a typicky pozostávajú len z malého počtu genotypov (Innes et al., 1986; Hebert, 1987; Ward et al., 1994). U organizmov s klonálnym rozmnožovaním je navyše genetická odlišnosť v populáciách s malým počtom klonov (nízkou klonálnou diverzitou, typickou pre dočasné nádrže) veľmi znížená vplyvom náhodnej asociácie aliel s určitými klonmi, čo vedie k pomerne vysokej odlišnosti susedných populácií (Vanoverbeke & De Meester, 1997).

Imbreeding depression je proces znižujúci zdatnosť potomkov, vzniknutých krížením medzi príbuznými jedincami, a prejavujúci sa zníženou plodnosťou potomkov (De Meester, 1993). Dochádza k nemu napríklad pri kolonizácii nových habitatov malou skupinou jedincov, niekedy dokonca len jedným klonom, alebo skupinou príbuzných klonov pochádzajúcich z jediného efípie. Takto vzniknutá nová populácia prechádza niekoľkými zúženiami početnosti (bottleneck), pri ktorých sa redukuje vnútro populačná variabilita a zvyšuje sa variabilita medzipopulačná (Haag et al., 2002).

Outbreeding depression je proces, ktorý znižuje zdatnosť potomkov, vzniknutých krížením medzi jedincami adaptovanými na lokálne podmienky, a novými imigrantami (De Meester, 1993). U pohlavne rozmnožujúcich sa druhov môže tento proces znižovať prebiehajúci genetický tok, keď dochádza ku kríženiu medzi novými migrantami a jedincami už prítomnými. V prípade, že ich genotypy boli adaptované na rôzne lokálne podmienky, majú potomci pochádzajúci z tohto kríženia nižšiu zdatnosť ako potomci čisto lokálnych jedincov (De Meester, 1993; De Meester et al., 2002).

Náhodná asociácia aliel medzi neutrálnymi markermi a úspešnými genotypmi. V populáciách organizmov s cyklickou partenogenezou môže pôsobiť fenomén podobný genetickému driftu, zvyšujúci genetickú diverzitu medzi populáciami. Pretože celý genóm tvorí počas partenogenetického množenia jeden celok, môže silná selekcia na niektorých lokusoch ovplyvniť tiež alelické frekvencie na neutrálnych markeroch, ktoré sú vtedy s nimi vo väzbe (Vanoverbeke & De Meester, 1997; Pálsson, 2001). Náhodná asociácia aliel môže pôsobiť významne len v

populáciách s nízkym počtom genotypov a tam, kde je dostatok času na pôsobenie klonálnej selekcie. Preto môže tento efekt pôsobiť významne len v malých populáciách s predĺženou periódou klonálnej reprodukcie. Podrobnejšie vid' De Meester et al. (2002).

Lokálne adaptácie a Monopolizačná hypotéza. Existuje mnoho štúdií, ktoré priniesli priame dôkazy naznačujúce vysoké hodnoty disperzie u zooplanktónu (De Meester et al., 2002), no zároveň genetické štúdie na molekulárne neutrálnych markeroch odhalili silnú genetickú diferenciáciu medzi populáciami zooplanktónu obývajúcimi lokality často blízko seba a naznačovali tak nízke hodnoty prebiehajúceho genetického toku (Hebert, 1974; Hebert, 1987; Crease et al., 1990; Boileau et al., 1992; Declerck et al., 2001). Tento zdanlivý paradox vysokej schopnosti disperzie a nízkeho genetického toku môže byť vysvetlený pomocou Monopolizačnej hypotézy (De Meester et al., 2002), ktorá je rozšírením hypotézy pretrvávajúceho efektu zakladateľa (Boileau et al., 1992). Podľa tejto teórie nasleduje po kolonizácii nového priaznivého prostredia (často malým počtom jedincov) rýchly populačný rast, čo vedie k monopolizácii zdrojov a následnému efektu priority. Nasledujúce rýchle adaptácie usídlených populácií na lokálne podmienky znevýhodňujú neskorších migrantov a tak redukujú efektívny genetický tok (De Meester, 1996; Okamura & Freeland, 2002). Pozorovaný efekt zakladateľa, ktorý často pretrváva po mnoho generácií je ďalej zosilovaný prítomnosťou veľkého počtu dormantných propagúl v banke kľudových štádií, ktoré účinne pufrujú inváziu nových genotypov a zabraňujú tak zmene alelických frekvencií spôsobenej genetickým tokom (Hairston, 1996; De Meester et al., 2002; Louette et al., 2007).

Faktory znížujúce genetickú diverzitu medzi populáciami:

Disperzia, čiže pohyb jedincov alebo propagúl (rozmnožovacích častíc) medzi priestorovo či časovo oddelenými lokalitami alebo populáciami, je u mnohých vodných bezstavovcov tradične považovaná ako častá a široko rozšírená (Bilton et al., 2001). Obzvlášť u skupín, ktoré sa šíria pasívne, je podporovaná mnohými záznamami, ako sú rýchla kolonizácia novo vytvorených habitatov (Jenkins, 1995; Jenkins & Buikema, 1998; Havel et al., 2000), široké rozšírenie niektorých vodných organizmov (Santamaría & Klaassen, 2002) či rýchla invázia exotických druhov (Havel et al., 1995). Avšak morfológické a hlavne molekulárne výskumy ukazujú na viac obmedzenú a menej častú disperziu (Bohonak & Jenkins, 2003). Kvôli obtiažnemu meraniu disperzie v prírodných podmienkach tak laboratórne experimenty s trvalými vajčkami a cystami skôr odrážajú potenciál pre pasívnu disperziu, než jej skutočnú hodnotu (Bohonak & Jenkins, 2003). Disperzia trvalých vajčiek u dafnií je pasívna, sprostredkovaná pomocou nejakého vektora.

Šírenie pomocou vetra ako vektora podrobne popisuje Cáceres & Soluk (2002) a Brendonck & Riddoch (1999). Michels et al. (2001a,b) a Cottenie et al. (2003) zase študovali schopnosti vodných organizmov šíriť sa pomocou vody ako vektora. Pasívnou disperziou vodných organizmov, hlavne zooplanktónu, pomocou vodných vtákov sa vo svojich prácach zaoberali Figuerola & Green (2002), Charalambidou & Santamría (2002) a Green & Figuerola (2005). Havel & Shurin (2004) sa vo svojich prácach sústredili hlavne na pasívnu disperziu pomocou iných zvierat a človeka. Celú problematiku, podrobne popisujúcu rôzne druhy disperzie u sladkovodných bezstavovcov, výborne zhrnuli Bilton et al. (2001).

Dobré priblíženie odhadu disperzných schopností organizmov v prírodných podmienkach ponúkajú genetické metódy. Sú založené na myšlienke, že v prípade významnej disperzie bude aj genetické zloženie súvislých populácií homogénne. Inými slovami, populácie budú zdieľať rovnaké alely a tieto alely budú mať tendenciu objavovať sa v rovnakých frekvenciách. No ak je disperzia medzi populáciami limitovaná, budú sa ako výsledok genetického driftu alebo prírodného výberu líšiť v genetickej kompozícii. Populácie sa tak budú líšiť v prítomných alelách a v ich relatívnych frekvenciách (Slatkin, 1985).

Pre kvantitatívne štúdium disperzie sú z mnohých dôvodov vhodné práve sladkovodné bezstavovce. Ich sladkovodné habitaty majú relatívne diskrétne hranice, a preto by mali byť oddelené aj ich populácie. Dokonca aj potoky a rieky môžu byť považované za viac oddelené než terestrické či morské systémy, kvôli ich prepojenosti iba v jednom rozmere oproti dvom (Bohonak & Jenkins, 2003). Len disperzia nasledovaná genetickým tokom môže redukovať genetickú rozdielnosť populácií (Bohonak, 1999) a prispievať tak k homogénnosti génov medzi populáciami (Havel & Shurin, 2004). Pasívna disperzia zooplanktónu driftom je umožnená pri prepojení jednotlivých nádrží (Havel & Shurin, 2004; Michels et al., 2001a,b; Frisch, 2002), čo je častým sezónnym javom v záplavových územiach. Vtedy môžu migrovať nielen kľudové štádiá, ale aj živé jedince (Brendonck et al., 2000), často vo vysokých počtoch, rádovo až tisícky za hodinu (Michels et al., 2001b).

Disperzia hrá dôležitú úlohu v ekológii a evolúcii týchto organizmov. Ovplyvňuje nielen dynamiku a udržiavanie lokálnych populácií, ich vymieranie a kolonizáciu prázdnych miest, ale tiež prispieva k vytváraniu štruktúry spoločenstva a genetickej štruktúry populácií.

Diapauza, čiže stav fyziologického kľudu a nízkej metabolickej aktivity, je dôležitou adaptáciou na prežívanie stresu spôsobeného kolísaním teploty, salinity a vlhkosti (Philippi et al., 2001). U perloočiek predstavujú diapauzné štádiá trvalé vajíčka, ktoré vytvárajú v sedimente dna **banku**

propagulí ekvivalentnú banke semien rastlín (Hairston, 1996) a zároveň predstavujú aj hlavné médium pasívnej disperzie (Bilton et al., 2001). Hustota týchto propagulí v sedimente môže byť často veľmi vysoká, rádovo 10^3 - 10^6 m⁻² (Hairston et al., 1995; Hairston, 1996).

Banky propagulí hrajú dôležitú úlohu v metapopulačnej biológii viacerých druhov vodných bezstavovcov. Môžu fungovať ako zásobáreň genetického materiálu a uplatňovať sa pri toku génov v čase (Bilton et al., 2001; Philippi et al., 2001). Môžu fungovať aj ako veľmi účinný mechanizmus obmedzujúci vplyv tzv. „abortívneho liahnutia,“ t.j. liahnutia pri príliš krátkom zaplavení, ktoré nepostačuje na dokončenie životného cyklu a následnej produkcií ďalšej generácie diapauzných štádií (Simovich & Hathaway, 1997; Philippi et al., 2001). Abortívne liahnutie je časté vo vysoko premenlivom prostredí (Brendonck, 1996; Simovich & Hathaway, 1997; Brendonck & Riddoch, 2000) a môže viesť k redukcii banky propagulí, alebo až k zániku populácie (Brendonck, 1996). Môžeme preto povedať, že pokiaľ má druh banku propagulí, je na danej lokalite chránený pred vyhynutím (Hairston, 1996).

Podrobnejšie popisujú niektoré tieto, ako aj ďalšie faktory pôsobiace na genetickú diverzitu populácií Lowe et al. (2004). Ďalšie menej významné procesy, pôsobiace na genetickú diverzitu populácií organizmov s cyklickou partenogézou, popisuje Berg (2005).

Materiál a metódy

Na zistenie vnútro populačnej a medzipopulačnej variability u oboch druhov a na testovanie našej hypotézy bolo nutné odobrať pomerne veľký počet jedincov z veľkého množstva lokalít. Preto sme najprv volili alozýmovú analýzu, ktorá v sebe kombinuje rýchlosť a možnosť analyzovať veľa jedincov naraz a v porovnaní s inými metodami (analýza DNA, mikrosatelity) je to metóda pomerne lacná. Ďalej nám táto metóda poskytuje možnosť porovnať získané výsledky s výsledkami iných štúdií. Táto metóda má však svoje obmedzenia a detekovaná variabilita je len približne 10 % variability na úrovni DNA (Nei, 1987). Preto sme sa snažili dosiahnuť splnenia cieľov tejto práce kombináciou alozýmovej analýzy a analýzou variability na vybraných úsekoch DNA.

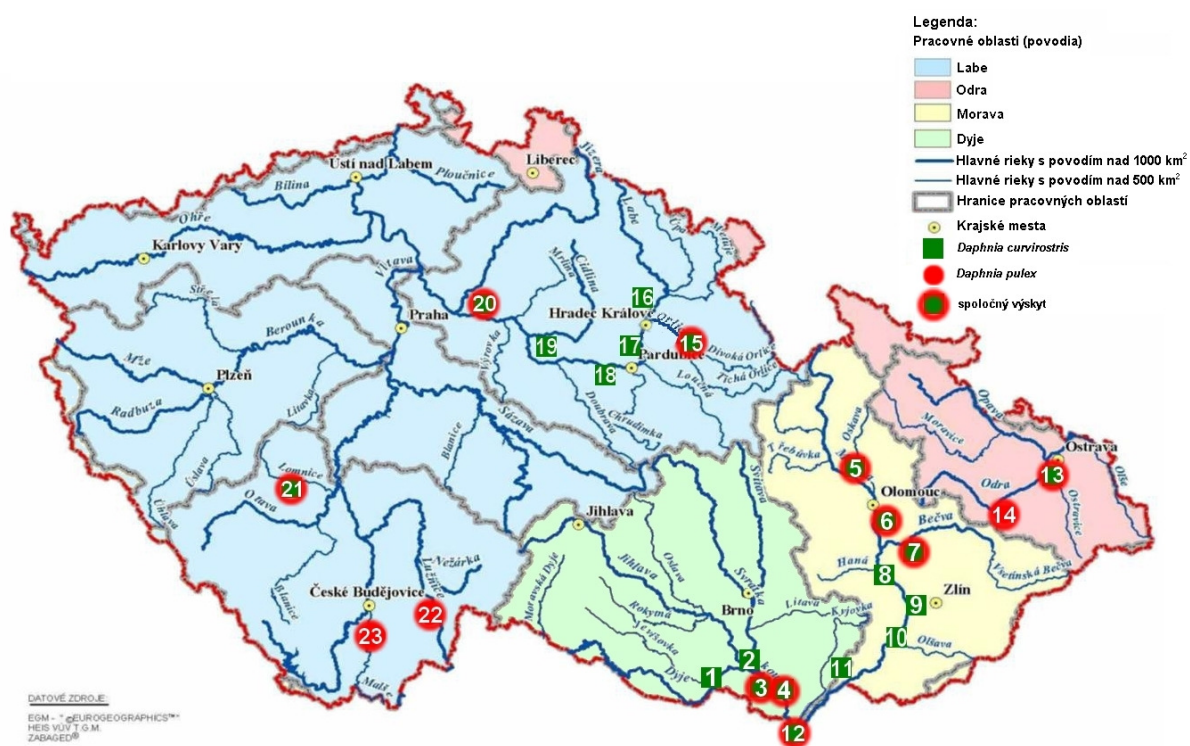
Úvod

Druh *Daphnia curvirostris* sa typicky vyskytuje v dočasných kalužiach pozdĺž tokov zväčša v jarnej obdobe. Preto sa náš záujem sústredil hlavne na lokality väčších nivných riek (Labe, Odra, Morava, Dyje), kde sa nachádzajú charakteristické lokality výskytu tohto druhu: kaluže, kanály so stojatou alebo pomaly tečúcou vodou, slepé a mŕtve oddelené korytá riek. Tie sú kvôli vyššiemu stavu vody v riekach z topiaceho sa snehu v jarnej obdobe zaplavené. V týchto lokalitách sa vyskytuje aj *D. pulex*, aj keď nie je obmedzená len na tieto biotopy. Po zaplavení sa dafnie vyliahnú z trvalých vajíčok, ktoré sú prítomné v sedimente dna. Vďaka svojej malej veľkosti (len niekoľko metrov) a malej hĺbke (často menej ako 30 cm) sú tieto lokality väčšiu časť roka vyschnuté, alebo v zime premrzajú často až na dno. Predstavujú preto extrémny biotop, na ktorý sa adaptovalo len niekoľko druhov organizmov.

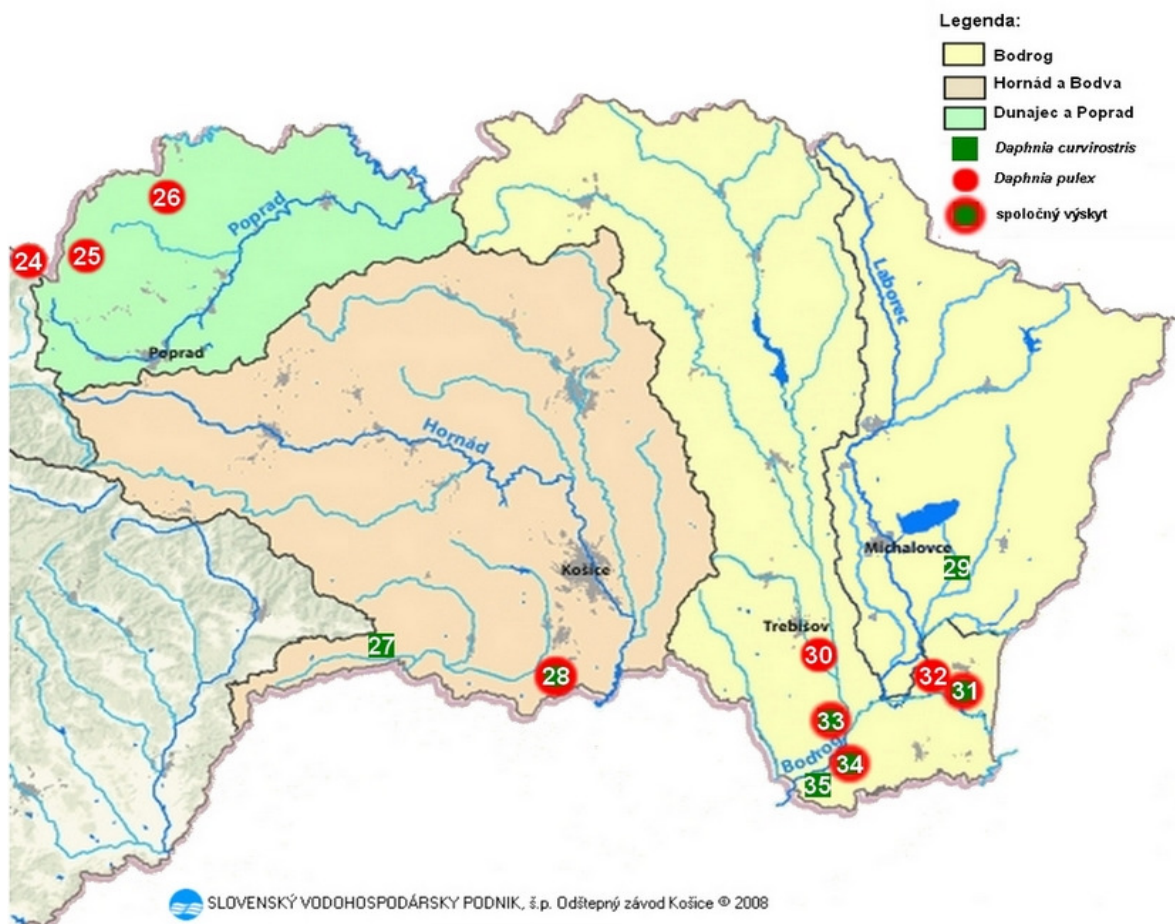
Lokality

V priebehu rokov 2005 až 2008 bolo za účelom tejto práce odobraných viac ako 100 lokalít z rôznych oblastí Českej republiky, nachádzajúcich sa hlavne v blízkosti riek Labe, Odry, Moravy a Dyje. Všetky odbery boli vykonané v jari (zväčša v apríli), kedy sú populácie reprezentované hlavne jedincami vyliahnutými z trvalých vajíčok a vznikli tak procesom pohlavného rozmnožovania. Ďalej boli do analýzy zahrnuté aj alozýmové dáta od Černý (1995), odobrané v rokoch 1991 a 1992 v Českej a Slovenskej republike.

Zoznam týchto lokalít a odberových miest je uvedený v tab. 1 a 2 a znázornený na obr. 1 a 2.



Obr.1. Mapa odberových miest v Českej republike. Podrobnejší popis je v legende obrázku.



Obr.2. Mapa odberových miest v Slovenskej republike. Podrobnejší popis je v legende obrázku.

Tab.1 Zoznam lokalít a odberových miest *D. curvirostris*. P¹ – povodie, do ktorého bola lokalita zahrnutá pri analýze: D – Dyje, M – Morava, S – sútok Moravy a Dyje, O – Odra, L – Labe, JC – Južné Čechy, SK – Slovensko. Mapa – číslo, ktoré na obr. 1 a 2 znázorňuje polohu lokality na mape.

Názov lokality	Oblasť, povodie	Kód	P ¹	Mapa	Zemepisná šírka	Zemepisná dĺžka	Dátum odberu
Drnholec 2	Podyje (Pálavsko)	DRN2	D	1	48°50'25"N	16°29'03"E	28.3.2007
Mošovský luh 2	Pri vod. nádrži Nové Mlýny	MOS2	D	2	48°54'35"N	16°35'24"E	28.3.2007
Plačkov les 2	Svratka nad vod.d. Nové Mlýny	PLAC2	D	2	48°56'54"N	16°35'60"E	28.3.2007
Nesyt 1	Podyje (Lednicko)	NES1	D	3	48°45'54"N	16°44'37"E	28.4.2006
Bulhary	Podyje (Lednicko)	JM03	D	3	48°50'04"N	16°45'11"E	17.5.1992
Nejdek 2	Podyje (Lednicko)	NEJ2	D	3	48°49'14"N	16°46'35"E	28.4.2006
Lednice 2	Podyje (Lednicko)	LED2	D	3	48°48'39"N	16°47'34"E	29.3.2007
Podivín	Podyje (Lednicko)	JM04	D	3	49°25'06"N	13°48'11"E	17.5.1992
Bruksa 1	Podyje (Břeclavsko)	BRUK1	D	4	48°45'58"N	16°52'01"E	28.4.2006
Moravičany 3	CHKO Litovelské Pomoravie	MOR3	M	5	49°45'02"N	17°00'19"E	02.4.2007
Hejtmanka 1	CHKO Litovelské Pomoravie	HEJ1	M	5	49°42'41"N	17°01'26"E	02.4.2007
Střeň 2	CHKO Litovelské Pomoravie	STR2	M	5	49°42'07"N	17°08'50"E	24.4.2006
Les Království 1	Pomoravie (Olomoucko)	KRAL1	M	6	49°31'20"N	17°18'30"E	26.4.2006
Les Kralovství 3	Pomoravie (Olomoucko)	KRAL3	M	6	49°31'02"N	17°17'28"E	26.4.2006
Žebračka 3	Povodie Bečvy	ZEB3	M	7	49°28'20"N	17°27'21"E	01.4.2007
Včelín 2	Pomoravie (Kroměřísko)	VCEL2	M	8	49°21'03"N	17°20'46"E	26.4.2006
Filena 1	Pomoravie (Kroměřísko)	FIL1	M	9	49°15'49"N	17°28'54"E	31.3.2007
Kunovický les 2	Pomoravie (Uherské Hradiště)	KUN2	M	10	49°03'40"N	17°26'31"E	31.3.2007
Očov 3	Pomoravie (Hodonínsko)	OCOV3	M	11	48°51'02"N	17°09'10"E	27.4.2006
Soutok 9	Sútok Moravy a Dyje	SOU9	S	12	48°37'34"N	16°56'17"E	27.4.2006
Soutok 12	Sútok Moravy a Dyje	SOU12	S	12	48°40'39"N	16°56'24"E	27.4.2006
Soutok 13	Sútok Moravy a Dyje	SOU13	S	12	48°41'36"N	16°57'10"E	30.3.2007
Soutok 15	Sútok Moravy a Dyje	SOU15	S	12	48°37'53"N	16°57'14"E	30.3.2007
Polanská niva 8	CHKO Poodří	POLN8	O	13	49°45'49"N	18°11'04"E	03.4.2007
Týniště 2	Týniště nad Orlicou	TYN2	L	15	50°09'55"N	16°04'03"E	13.4.2007
Smiřice 1	Labe nad Hradec Králové	SMIR1	L	16	50°19'35"N	15°53'06"E	12.4.2007
Čeperka 1	Labe pod Hradec Králové	CEP1	L	17	50°08'04"N	15°45'40"E	12.4.2007
Pohránov 1	Stredné Polabie	POH1	L	17	50°04'28"N	15°45'06"E	12.4.2007
Valy	Pardubicko	VS01	L	18	50°01'57"N	15°36'52"E	08.9.1992
Libice 2	Stredné Polabie	LIB2	L	19	50°06'06"N	15°10'49"E	21.4.2007
Přerov 3	Stredné Polabie	SC13	L	20	50°10'13"N	14°48'50"E	23.4.1992
Přerov 4	Stredné Polabie	SC14	L	20	50°10'05"N	14°48'49"E	23.4.1992
Přerov 1	Stredné Polabie	SC11	L	20	50°10'06"N	14°48'40"E	23.4.1992
Přerov 2	Stredné Polabie	SC12	L	20	50°10'07"N	14°48'40"E	23.4.1992
Přerov n. Labem	Stredné Polabie	PRER	L	20	50°10'03"N	14°48'24"E	11.5.2006
Tůň u Starého	Blatensko	BL62	JC	21	49°25'45"N	13°49'16"E	28.4.1992
Hrhov	Východné Slovensko	VS01	SK	27	48°36'01"N	20°44'48"E	11.5.1992
Perin - Chym	Východné Slovensko	VS08	SK	28	48°32'20"N	21°08'58"E	11.5.1992
Ináčovce	Východné Slovensko	VS03	SK	29	48°41'06"N	22°03'36"E	13.5.1992
Kapušany 6	Východné Slovensko	VS18	SK	31	48°30'37"N	22°03'18"E	13.5.1992
Kapušany 3	Východné Slovensko	VS16	SK	31	48°30'02"N	22°03'14"E	13.5.1992
Kapušany 4	Východné Slovensko	VS17	SK	31	48°29'50"N	22°03'39"E	13.5.1992
Zemplín	Východné Slovensko	VS20	SK	33	48°27'16"N	21°48'14"E	12.5.1992
Somotor - Věč	Východné Slovensko	VS09	SK	34	48°24'48"N	21°49'20"E	12.5.1992
Streda n. Bodrogom	Východné Slovensko	VS11	SK	35	48°23'47"N	21°44'57"E	12.5.1992

Tab.2 Zoznam lokalít a odberových miest *D. pulex*. Popiska vid' popisku tab. 1

Názov lokality	Oblasť, povodie	Kód	P ¹	Mapa	Zemepisná šírka	Zemepisná dĺžka	Dátum odberu
Bulhary	Podyje (Lednicko)	JM05	D	3	48°50'04"N	16°45'11"E	17.5.1992
Kančí obora 2	Podyje (Břeclavsko)	KAN2	D	4	48°46'05"N	16°52'08"E	29.3.2007
Střeň 2	CHKO Litovelské Pomoravie	STR2	M	5	49°42'07"N	17°08'50"E	24.4.2006
Horka 1	Pomoravie (Olomoucko)	HOR1	M	5	49°39'16"N	17°11'38"E	02.4.2007
Les Království 3	Pomoravie (Olomoucko)	KRAL3	M	6	49°31'02"N	17°17'28"E	26.4.2006
Žebračka 3	Povodie Bečvy	ZEB3	M	7	49°28'20"N	17°27'21"E	01.4.2007
Soutok 15	Sútok Moravy a Dyje	SOU15	S	12	48°37'53"N	16°57'14"E	30.3.2007
Suchdol 1	CHKO Poodrie	SUCH1	O	14	49°38'58"N	17°57'39"E	25.4.2006
Suchdol 2	CHKO Poodrie	SUCH2	O	14	49°39'08"N	17°57'45"E	25.4.2006
Polanská niva 8	CHKO Poodrie	POLN8	O	13	49°45'49"N	18°11'04"E	03.4.2007
Běleč 1	Orlice	BEL1	L	15	50°12'04"N	15°55'39"E	13.4.2007
Týniště 2	Týniště nad Orlicou	TYN2	L	15	50°09'55"N	16°04'03"E	13.4.2007
Přerov 2	Stredné Polabie	SC52	L	20	50°10'07"N	14°48'40"E	23.5.1992
Přerov 1	Stredné Polabie	SC51	L	20	50°10'06"N	14°48'40"E	23.5.1992
Přerov 3	Stredné Polabie	SC53	L	20	50°10'13"N	14°48'50"E	23.4.1992
Tůň u Smyslova	Blatensko	BL61	JC	21	49°25'06"N	13°48'11"E	18.5.1992
Tůň u Starého	Blatensko	BL51	JC	21	49°25'45"N	13°49'16"E	28.4.1992
Římov - priehrada	Južné Čechy	JC09	JC	23	48°50'53"N	14°29'18"E	20.5.1992
Horní Luž. Kulatá	Južné Čechy	JC01	JC	22	48°55'04"N	14°53'16"E	20.11.1991
Horní Luž. Podlouhlá	Južné Čechy	JC06, JC07	JC	22	48°54'28"N	14°47'19"E	30.10.1991, 21.5.1992
Horní Luž. Rameno	Južné Čechy	JC08	JC	22	48°54'28"N	14°47'19"E	30.10.1991
Horní Luž. U domu	Južné Čechy	JC05	JC	22	48°54'28"N	14°47'19"E	21.5.1992
U dubu východ	Južné Čechy	JC04	JC	22	48°54'28"N	14°47'19"E	21.5.1992
U dubu západ	Južné Čechy	JC02, JC03	JC	22	48°54'28"N	14°47'19"E	20.11.1991, 21.5.1992
Veľké Tomanové	Vysoké Tatry	TA53, TA54	SK	24	49°13'03"N	19°54'36"E	11.10.1991, 08.10.1992
Tiché	Vysoké Tatry	TA51, TA52	SK	25	49°12'57"N	20°07'56"E	04.10.1990, 18.10.1991
Jazerské Jazero	Východné Slovensko	VS04, VS05	SK	26	49°16'58"N	20°20'51"E	06.10.1991, 28.9.1992
Perín - Chym	Východné Slovensko	VS58	SK	28	48°32'20"N	21°08'58"E	11.5.1992
Ondava 1	Východné Slovensko	VS07	SK	30	48°30'32"N	21°48'35"E	13.5.1992
Kapušany 3	Východné Slovensko	VS14	SK	31	48°30'02"N	22°03'13"E	13.5.1992
Kapušany 6	Východné Slovensko	VS19	SK	31	48°30'37"N	22°03'17"E	13.5.1992
Kapušany 1	Východné Slovensko	VS13	SK	32	48°31'26"N	22°03'13"E	13.5.1992
Zemplín	Východné Slovensko	VS21	SK	33	48°27'16"N	21°48'14"E	12.5.1992
Somotor - Věč	Východné Slovensko	VS10	SK	34	48°24'48"N	21°49'20"E	12.5.1992

¹ súbor populácií Južné Čechy formálne patrí do povodia Vltavy a celkovo Labe a súbor Slovensko do povodia Tisy a Dunajca, ale keďže podľa našej hypotézy nepredpokladáme priame prepojenie s ostatnými lokalitami pomocou vody ako vektora pasívnej disperzie (žiadne populácie pod sútokom Vltavy a Labe neboli analyzované), boli tieto skupiny pre jednoduchosť pomenované geografickými názvami.

Odber a spracovanie vzoriek

K odberu sme používali vo väčšine prípadov planktónnu sieť na teleskopickej tyči. Planktónnou sieťou (veľkosť ôk 100 µm) sa odobrala vzorka, tá sa vyliala do misky s vodou a podľa množstva dafnií a žiabronôžiek (pre potreby ďalších častí celého projektu) sa odobrala ďalšia vzorka. Pri veľmi malých kalužiach sa ako vynikajúca pomôcka k odberu ukázalo sitko na čaj. Dafnie boli väčšinou triedené na mieste do samostatnej nádoby s vodou a umiestnené živé do prenosnej chladničky. Poloha lokality sa vždy zamerala pomocou GPS prístroja a bola spolu so stručnou charakteristikou miesta zapísaná. Po skončení odberu daného dňa sme v laboratóriu spracovávali odobrané vzorky. Ešte živé dafnie sa znova prebrali pomocou pipiet a misiek a približne 50 najväčších kusov bolo zmrazených v tekutom dusíku pre potreby neskoršej alozýmovej analýzy. Ďalších asi 10 kusov dafnií bolo fixovaných v 95% etanole pre potreby DNA analýzy. Všetky vzorky boli riadne popísané a popis bol zaznačený do protokolu. Po návrate z odberovej expedície sa vzorky z tekutého dusíka umiestnili do mrazničky a tam boli pri teplote -79 °C skladované.

Elektroforéza alozýmov

Pre elektroforézu alozýmov sme použili metodiku podľa Hebert & Beaton (1989).

S použitím literatúry (Černý, 1995; Černý & Hebert, 1999; Michels et al., 2003) bolo nakoniec pre elektroforézu na acetylcelulózovom géle vybraných šesť enzýmov a na nich bola analyzovaná variabilita. Boli to aldehyd-oxidáza (**AO**, EC 1.2.3.1), laktát-dehydrogenáza (**LDH**, EC 1.1.1.27), aspartát-aminotransferáza (**AAT**, EC 2.6.1.1; tiež známy ako glutamát-oxalacetát-transferáza, GOT), glukóza-6-fosfát-izomeráza (**GPI**, EC 5.3.1.9; tiež označovaný ako fosfoglucoizomeráza, PGI), manóza-6-fosfát-izomeráza (**MPI**, EC 5.3.1.8) a fosfoglukomutáza (**PGM**, EC 5.4.2.2). Vybraných päť enzýmov vykazovalo vnútrodruhovou variabilitu. Laktát dehydrogenáza vykazovala medzidruhovou variabilitu a slúžila tak pre potreby dodatočného oddelenia druhu *Daphnia curvirostris* od druhu *D. pulex*. U druhu *D. curvirostris* je na lokuse pre LDH fixovaná alela **C** a u druhu *D. pulex* pomalšia alela **B** (Michels et al., 2003). Jednotlivé alely boli označované podľa ich mobility: **A** (najpomalšia alela) < **B** < **C** < **D** (stredná) < **E** < **F** (najrýchlejšia).

Pre lepšie rozlíšenie boli alely skórované porovnávaním so štandardným klonom so známym fenotypom. Ako štandard bola použitá obligátne asexuálna americká *D. pulex* z laboratórnych chovov (pôvodom z botanickej záhrady vo Frankfurte nad Mohanom) s týmto fenotypom: (AO: **FF**, LDH: **BB**, AAT: **CD**, GPI: **DD**, MPI: **CC**, PGM: **DC**).

Z každej populácie sme sa snažili analyzovať aspoň 40 jedincov. Dáta od Černý (1995) boli skórované rovnakým spôsobom a alely boli taktiež označené podľa ich mobility, takže boli bez

väčších problémov² prevedené na jednotný skórovací systém používaný v tejto práci. Odbery z tých istých lokalít, ale v rôznych rokoch, ukázali, že genotypové frekvencie väčšiny populácií z periodických habitatov sú stabilné v čase (Hebert, 1987; Innes, 1991). Prípadné pozorované fluktuácie sú v mnohých prípadoch nesignifikantné (Černý, 1995).

Analýzy dát

Prvým krokom po skončení elektroforézy bolo previesť surové dáta zo skórovacích gélov do elektronickej podoby tabuľkového editoru a ich následná úprava. K tomuto účelu sme používali program Microsoft Excel z balíka Microsoft Office 2003. Takto získané upravené dáta sa dali pomocou programu Convert 1.31 (Glaubitz, 2004) transformovať do podoby potrebnej pre analýzy v rôznych štatistických programoch. Tak napríklad základné populačné genetické dáta ako alelické frekvencie, heterozygotnosť, genetická vzdialenosť, Wrightov fixačný index F_{ST} apod., boli získané pomocou programu PopGene 32 (Yeh et al., 1997).

Získané alelické frekvencie zo šiestich lokusov boli použité na konštrukciu multilokusových genotypov (MLG). Každý jedinečný šesťlokusový MLG bol v ďalších analýzach považovaný za jeden klon, aj keď je veľmi pravdepodobné, že v skutočnosti reprezentoval skupinu klonov.

Pre testovanie odchýlky od H-W rovnováhy bol použitý exaktný ***p*-test** v programe GENEPOP 1.2 (Raymond & Rousset, 1995). Pravdepodobnosť, či sa daná populácia nachádza v H-W rovnováhe, bola počítaná pre každú populáciu a pre každý lokus osobitne, s použitím programu exaktného testu založeného na algoritmoch Markovovho reťazca (Markov chain). Výsledná pravdepodobnosť pre danú lokalitu na všetkých lokusoch sa získala vynásobením pravdepodobností pre všetky lokusy danej lokality³. Ako signifikantne odlišný výsledok od H-W rovnováhy bol považovaný ten, ktorého hodnota *p* bola menšia než 0,05, upravená kvôli veľkému počtu súčasne prebiehajúcich testov (82) pomocou Bonferoniho korekcie (Rice, 1989) na tzv. efektívne $p=0,0006$.

Ďalší spôsob testovania odchýlky od H-W rovnováhy, a zároveň poukazujúci na rozmnožovací systém, je **index genotypovej diverzity (GDR Genotypic Diversity Ratio)**. Počíta sa ako podiel pozorovaného a očakávaného počtu MLG. Priemerný očakávaný počet MLG a jeho rozptyl sa získava opakovaním 100 simulácií s použitím rovnako veľkej, sexuálne sa rozmnožujúcej,

² problémový bol len lokus AO, kde Černý (1995) rozlišoval šesť aliel a ja najprv tri a neskôr štyri, takže niektoré alely boli zlúčené do jednej a ich konečný počet je päť.

³ z analýzy exaktného testu na H-W rovnováhu bol vylúčený lokus AO, z dôvodu vysokej signifikancie testu takmer u všetkých populácií. To mohlo byť spôsobené zavedením piatich aliel pri zjednocovaní výsledkov z troch rôznych spôsobov skórovania tohto lokusu, čo mohlo vytvárať zdieľanie nenáhodného párovania aliel a následnej odchýlky od H-W rovnováhy.

panmiktickej populácie, s rovnakými frekvenciami aliel, aké boli u pôvodnej populácie (Innes et al., 1986, Hebert et al., 1988). Podiel blízky hodnote jedna znamená, že populácia sa nachádza v H-W rovnováhe. Štatistická významnosť podielov skutočných a priemerných vypočítaných hodnôt bola testovaná pomocou jednostranného t-testu (Sokal & Rohlf, 1995).

Na základe pozorovaných a očakávaných MLG sa mohlo usudzovať o rozmnožovacom systéme. Populácia bola považovaná za cyklicky partenogenetickú, ak odchýlka genotypických frekvencií od H-W rovnováhy neprekročila zvolenú hranicu významnosti a GDR nebolo významne nižšie ako 1 (respektíve počet pozorovaných genotypov nebol signifikantne nižší ako počet očakávaných). Populácia bola považovaná za obligátne partenogenetickú ak sa genotypické frekvencie významne odlišovali od H-W rovnováhy a GDR bolo významne nižšie ako 1. V populáciach, ktoré sa signifikantne líšili od H-W rovnováhy, ale GDR sa významne nelíšilo do hodnoty 1, alebo sa významne nelíšili od H-W rovnováhy, ale GDR bolo významne nižšie ako 1, bol rozmnožovací systém označený ako neistý.

K získaniu kvantitatívneho odhadu genetickej diferenciácie medzi populáciami u oboch druhov a k porovnaniu medzi rozdielnymi taxonomickými skupinami bola použitá Neiova genetická vzdialenosť (Nei, 1978) a F-štatistika (Wright, 1965).

Všetky párové genetické vzdialenosti medzi populáciami boli vyjadrené ako **Neiova genetická vzdialenosť** a boli počítané v programe PopGen 32 (Yeh et al., 1997). Získané matice genetických vzdialeností boli pomocou neváženej párovej zhlukovacej metódy (UPGMA) a štatistického programu Statistica 5.1 (StatSoft, 1998) využité na konštrukciu dendrogramu.

AMOVA (Analysis of **M**olecular **V**ariance) analýza molekulárnej odlišnosti odhaduje genetickú štruktúru populácií pomocou hierarchickej Wrightovej F-štatistiky (Weir & Cockerham, 1984), ktorá využíva informácie o alelickom zložení haplotypov a ich frekvencií. Pre jednotlivé úrovne genetickej štruktúry populácií bol vyčíslený príslušný fixačný index: medzi jedincami F_{IS} , medzi populáciami F_{ST} , medzi populáciami v rámci skupín F_{SC} a medzi skupinami navzájom F_{CT} . Výsledné hodnoty F indexov boli testované s použitím neparametrických permutačných metód. Vo tejto práci sme používali AMOVA algoritmy zo softwarového balíku Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2005).

Hierarchické usporiadanie populácií pre AMOVA analýzy zodpovedalo členeniu populácií do povodí uvedených v tab. 1 a 2 a znázornených na obr. 1 a 2.

K získaniu signifikantných rozdielov v alelických frekvenciách medzi povodiami bol použitý exaktný test v programe GENEPOP 1.2 (Raymond & Rousset, 1995), ktorý je založený na

algoritmov Markovovho reťazca. Následne bol k získaniu celkovej signifikancie testu alelických frekvencií pre všetky lokusy použitý Fisherov kombinovaný pravdepodobnostný test.

Vzťah medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou medzi populáciami bol znázornený graficky vynesением párových Neiových genetických vzdialeností (PopGen 32, Yeh et al., 1997) a príslušných párových geografických vzdialeností. Geografické vzdialenosti medzi každou dvojicou populácií boli počítané z GPS súradníc pomocou Haversineho formuly⁴ (<http://www.movable-type.co.uk/scripts/latlong.html>) v programe Microsoft Excel z balíka Microsoft Office 2003. Získaná matica párových geografických vzdialeností bola potom porovnávaná s príslušnou maticou genetických vzdialeností.

Použitím Mantelovho testu (Sokal & Rohlf, 1995) v programe PopTools v.3.0.5. (Greg Hood (2008), CSIRO, Canberra, Australia, <http://www.cse.csiro.au/poptools/>) s počtom 10 000 iterácií pre randomizačný test bola testovaná signifikancia lineárnej závislosti medzi týmito dvoma premennými. Táto analýza bola urobená separátne pre oba druhy.

⁴ vzdialenosť d [km] medzi dvoma miestami so známou zemepisnou šírkou a dĺžkou bola počítaná ako:

$$d = \arccos(\sin(\text{lat}_1) \times \sin(\text{lat}_2) + \cos(\text{lat}_1) \times \cos(\text{lat}_2) \times \cos(\text{long}_2 - \text{long}_1)) \times R$$

lat = zemepisná šírka, long = zemepisná dĺžka, $R = 6371$ (polomer Zeme v km).

Výsledky

Pre overenie našej hypotézy, že populácie v rámci povodí sú vzájomne geneticky podobnejšie než populácie patriace k rozdielnym povodiam, sme potrebovali najprv zistiť, aká veľká je variabilita vo vnútri populácií. Táto variabilita sa potom porovnáva medzi sebou na rôznych hierarchických stupňoch: medzi populáciami navzájom, medzi populáciami v rámci povodí a medzi povodiami. Takto sa dala testovať naša hypotéza u oboch druhov, ktoré sa mierne líšia svojou ekológiou a výsledky sa mohli vzájomne porovnať. Podľa našej pracovnej hypotézy by najväčšia variabilita mala byť medzi populáciami z rôznych povodí a minimálna medzi populáciami v rámci rovnakého povodia. To by malo byť dôsledkom obmedzenej disperzie medzi rozdielnymi povodiami a väčšou prepojenosťou populácií v rámci jedného povodia.

Na zistenie vnútro populačnej variability je veľmi vhodná metóda analýzy enzýmovej variability (alozýmy), lebo umožňuje rýchlo, pomerne jednoducho a lacno analyzovať veľké množstvo jedincov.

Enzýmová variabilita

Jedným z prvých a najjednoduchších spôsobov, ako je možné porovnať variabilitu medzi dvoma druhmi, je rozlíšiť výskyt jednotlivých aliel a ich frekvencií na skúmaných lokusoch.

Elektroforézou alozýmov bolo zistených 28 aliel u *D. curvirostris* a 26 u *D. pulex* na šiestich polymorfných lokusoch. Enzýmová variabilita na skúmaných lokusoch bola veľmi vysoká. Všetkých šesť lokusov u oboch druhov vykazovalo variabilitu v niektorých populáciách. Výsledné alelické frekvencie pre každý lokus pre oba druhy zobrazuje tab. 3 a pre každú populáciu tab. I-3 a I-4 (prílohy). Najviac variabilné lokusy a zároveň lokusy s maximálnym počtom aliel na lokus boli u oboch druhov PGM a MPI. Oba mali zhodne po šesť aliel, aj keď niektoré (*D. curvirostris* PGM – A, F; MPI – A, B, E, F a *D. pulex* PGM – A, B, E, F; MPI – A, E, F) boli vzácne a neprevyšovali frekvenciu výskytu 0,05 (5 %). Celkovo bolo u *D. curvirostris*, resp. *D. pulex* zistených 13 (46 %), resp. 16 (62 %) vzácných aliel.

U laktát dehydrogenázy LDH bola frekvencia alely C u *D. curvirostris* a B u *D. pulex* väčšia ako 99 %, čo znamená, že ostatné alely nepresiahli stanovenú hranicu 1 %, a preto môžeme tento gén považovať za monomorfný. Takmer vo všetkých populáciách bola na lokuse pre LDH fixovaná u *D. curvirostris* alela C a u *D. pulex* alela B. U piatich jedincov z populácie JM03 sa vyskytovala aj alela B heterozygotne s alelou C a u piatich jedincov z populácie TA51 to bola alela A a u 11 jedincov z populácie TYN2 alela C. Obidve sa vždy vyskytovali heterozygotne s alelou B.

Tab. 3. Tabuľka alelických frekvencií na skúmaných lokusoch pre všetky populácie u oboch druhov dafnií. Mobilita aliel sa zvyšuje od alely A (najpomalšia) po alelu F (najrýchlejšia). Dominantné alely s výskytom väčším ako 0,5 (50 %) sú vyznačené tučným písmom.

	<i>D. curvirostris</i>						<i>D. pulex</i>					
lokus	PGM	PGI	MPI	LDH	AO	AAT	PGM	PGI	MPI	LDH	AO	AAT
A	0,0391	0,0117	0,0003		0,0003	0,0023	0,0004		0,0017	0,0004	0,002	
B	0,1773	0,0094	0,0388	0,0045	0,0778	0,036	0,0229	0,0012	0,1009	0,9988	0,9036	0,0069
C	0,2507	0,7553	0,0512	0,9955	0,234	0,8863	0,038	0,0259	0,7094	0,0008	0,0818	0,9229
D	0,4016	0,1631	0,8995		0,6872	0,0755	0,9221	0,9662	0,1826		0,0126	0,0702
E	0,1108	0,0605	0,004		0,0007		0,0142	0,0067	0,0046			
F	0,0205		0,006				0,0024		0,0008			

Alozymové dáta z lokalít so spoločným výskytom oboch druhov nenaznačovali, žeby dochádzalo k hybridizácii medzi týmito druhmi. Alely unikátne pre jeden druh boli zistené na troch lokusoch: *D. curvirostris* PGI – A, AAT – A a *D. pulex* LDH – A. Vyskytovali sa však vo veľmi nízkych frekvenciách, preto nemôžu byť využité ako druhovo špecifický znak. Ostatné alely boli zdieľané medzi obidvoma druhmi, líšili sa však vo frekvenciách výskytu. Až na výnimku lokusu AAT, kde bola u oboch druhov prítomná dominantná alela C, sa významne líšili v prítomnosti dominantných aliel na ostatných lokusoch – viď tab. 3.

Genetická variabilita v rámci populácií

Aby sme mohli porovnávať variabilitu medzi povodiami a v rámci povodí, potrebovali sme zistiť veľkosť variability prítomnej na úrovniach jednotlivých lokálnych populácií. Táto variabilita sa vyjadruje pomocou štandardných indexov diverzity (tab. 4) počítaných v populačne genetických programoch, čo poskytuje aj možnosť medzidruhového porovnania.

Genetická variabilita bola analyzovaná u 45 populácií druhu *D. curvirostris* s priemerným počtom 34,3 jedincov na populáciu a u 39 populácií *D. pulex* s priemerným počtom 32,6 jedincov na populáciu. Základné vnútro populačné charakteristiky sú súhrnne pre oba druhy uvedené v tab. 4 a podrobne pre všetky populácie v prílohe v tab. I-1 a I-2.

Genetická variabilita na aspoň jednom lokuse bola zistená u oboch druhov vo všetkých populáciách, s jedinou výnimkou u *D. pulex* (populácia JM05), kde bol počet jedincov len dva. *D. curvirostris* vykazovala väčšie množstvo polymorfných lokusov (63 %) v porovnaní s *D. pulex* (49 %) a mala aj vyšší priemerný počet aliel na lokus 4,67 oproti 4,33. S tým súvisí aj vyšší priemerný⁵ počet pozorovaných MLG rovných 17,39 v porovnaní s 7,77. Počet genotypov (MLG) vzrastal u *D. curvirostris* takmer lineárne s veľkosťou vzorky ($r=0,4489$; $p=0,002$) s výnimkou

⁵ vzhľadom na rôzny počet analyzovaných jedincov u oboch druhov a v populáciách som použil vážený aritmetický priemer (váhy boli počty jedincov v populáciách).

CEP1, VS01 a JM04, ktoré mali len 2 až 5 genotypov na viac ako 40 jedincov. U *D. pulex* bola korelácia medzi veľkosťou vzorky a počtom genotypov nesignifikantná ($r=0,2719$; $p=0,094$) (nezobrazené dáta). Pozorovaná priemerná heterozygotnosť pre 45 populácií *D. curvirostris* kolísala v rozmedzí od 0,03 až po 0,38 a pre 39 populácií *D. pulex* v rozmedzí od 0 po 0,37. Priemer pre všetky populácie kopíroval ostatné vnútro populačné genetické charakteristiky a bol u *D. curvirostris* približne dvojnásobný (0,17) ako u *D. pulex* (0,09).

Tab. 4. Vybrané vnútro populačné charakteristiky a ich smerodajné odchýlky (SD) pre oba druhy.

	<i>D. curvirostris</i>	SD	<i>D. pulex</i>	SD
počet populácií	45		39	
počet analyzovaných jedincov	1545		1272	
populácie mimo H-W rovnováhy	10		5	
% polymorfných lokusov	63	21,29%	49	22,18%
priemerný počet aliel na lokus	4,67	1,51	4,33	1,37
efektívny počet aliel	1,79	0,99	1,24	0,30
priemerný počet MLG ⁶	17,39	9,31	7,77	5,35
očakávaná heterozygotnosť	0,33	0,25	0,16	0,16
pozorovaná heterozygotnosť	0,17	0,16	0,09	0,08
F _{ST}	0,32		0,30	

Hardy-Weinbergova rovnováha a rozmnožovací systém

Aby sme mohli lepšie porozumieť procesom, ktoré vplyvajú na genetickú diverzitu populácií oboch študovaných druhov, je dôležité poznať, či sa populácie líšia od H-W rovnováhy a aký je ich rozmnožovací systém. Oba tieto parametre môžu veľa napovedať o pôsobení rôznych procesov vplyvujúcich na genetickú diverzitu populácií napr. klonálnej selekcie, nenáhodného kríženia, príbuzenského kríženia (inbreeding) a pod.

S použitím exaktného testu v programe GENEPOP 1.2 (Raymond & Rousset, 1995) sa p -hodnota alelických frekvencií signifikantne líšila ($p<0,05$) od H-W rovnováhy aspoň na jednom lokuse u 22 populácií *D. curvirostris* a u 9 *D. pulex* (nezobrazené dáta). Po výslednej Bonferroniho korekcii zostalo signifikantne odlišných od H-W rovnováhy len 10 populácií *D. curvirostris* a 5 populácií *D. pulex* (príloha tab. I-1 a I-2). Väčšinou bol v týchto populáciách pozorovaný deficit heterozygotov. Tento test získava výslednú pravdepodobnosť vynásobením čiastkových pravdepodobností pre každý lokus⁷, preto stačilo, aby jeden z lokusov bol vysoko signifikantne odlišný od H-W rovnováhy ($p=0$) a tým sa aj výsledná pravdepodobnosť pre celú populáciu stala

⁷ z analýzy exaktného testu na H-W rovnováhu bol vylúčený lokus AO. Podrobnosti v kapitole Materiál a metódy.

signifikantná. Z tohto dôvodu bol použitý aj iný spôsob odhadu odchýlky od H-W rovnováhy – index genotypovej diverzity GDR.

Hodnoty GDR kolísali medzi populáciami *D. curvirostris* v rozmedzí 0,34-1,26 a *D. pulex* 0,48-1,31 (príloha tab. I-1 a I-2). Signifikantne odlišné od H-W rovnováhy vyšli len dve populácie *D. curvirostris* - CEP1 a SOU12. Populácia CEP1 mala na 44 jedincov len dva genotypy, čo môže indikovať klonálne množenie, ale môže to byť aj dôsledok nízkeho stupňa polymorfizmu v tejto populácii. Populácia SOU12 vyšla na hranici signifikancie 0,05 - stupeň polymorfizmu bol tam veľký, ale bol tam vysoký deficit heterozygotov, čo môže indikovať príbuzenské kríženie alebo Wahlundov efekt. Žiadna zo skúmaných populácií *D. pulex* nevykazovala signifikantnú odchýlku od H-W rovnováhy implikujúcu klonálne množenie, takže celkovo nízka MLG diverzita skôr odráža nízku alelickú diverzitu (príloha tab. I-4).

Rozmnožovací systém vyšiel takmer vo všetkých prípadoch ako cyklická partenogéza. To znamená, že životný cyklus zahŕňa fázu nielen klonálneho množenia, ale aj sexuálnu fázu, ktorá generuje genetickú variabilitu. Jedine populácia SOU12 vyšla ako obligátne partenogenetická. V 9 populáciách *D. curvirostris* a 5 *D. pulex* bol rozmnožovací systém označený ako neistý.

Genetická diferenciácia medzi populáciami

Na odhad rozsahu genetickej diferenciácie medzi populáciami bola použitá F-štatistika a Neiova genetická vzdialenosť. Aby sme zistili rozdiely medzi jednotlivými skupinami (povodiami), testovali sme pomocou exaktného testu rozdiely v alelických frekvenciách medzi povodiami a pomocou AMOVA-y sme rozložili variabilitu na medzipopulačnú, medzipopulačnú v rámci povodí a variabilitu medzi povodiami.

Priemerné hodnoty F_{ST} pre jednotlivé lokusy kolísali u *D. curvirostris* v rozmedzí od 0,08 po 0,42 a u *D. pulex* od 0,02 po 0,53 (tab. 5).

Priemerné hodnoty F_{ST} pre všetky lokusy⁸ 0,32 (*D. curvirostris*) a 0,30 (*D. pulex*) značia stredne veľkú diferenciáciu medzi populáciami. Podobne ukazujú stredne veľkú diferenciáciu medzi populáciami aj Neiove genetické vzdialenosti - priemerná Neiova genetická vzdialenosť bola u *D. curvirostris* 0,185 (SD=0,151) a u *D. pulex* 0,091 (SD=0,101), najväčšia hodnota pre *D. curvirostris* bola 0,959 (medzi KRAL1 a VS08) a pre *D. pulex* 0,6434 (medzi TA51 a VS58). Ostatné Neiove genetické vzdialenosti pre všetky páry populácií sú znázornené ako dendrogram na obr.7 a 8.

⁸ Hodnota F_{ST} vyjadruje vážený priemer pre všetky lokusy a je získaná z AMOVA-y podľa (Weir & Cockerham, 1984).

Tab.5 F-štatistika (Nei, 1987) pre každý lokus pre všetky populácie u oboch druhov a priemer zo všetkých lokusov.

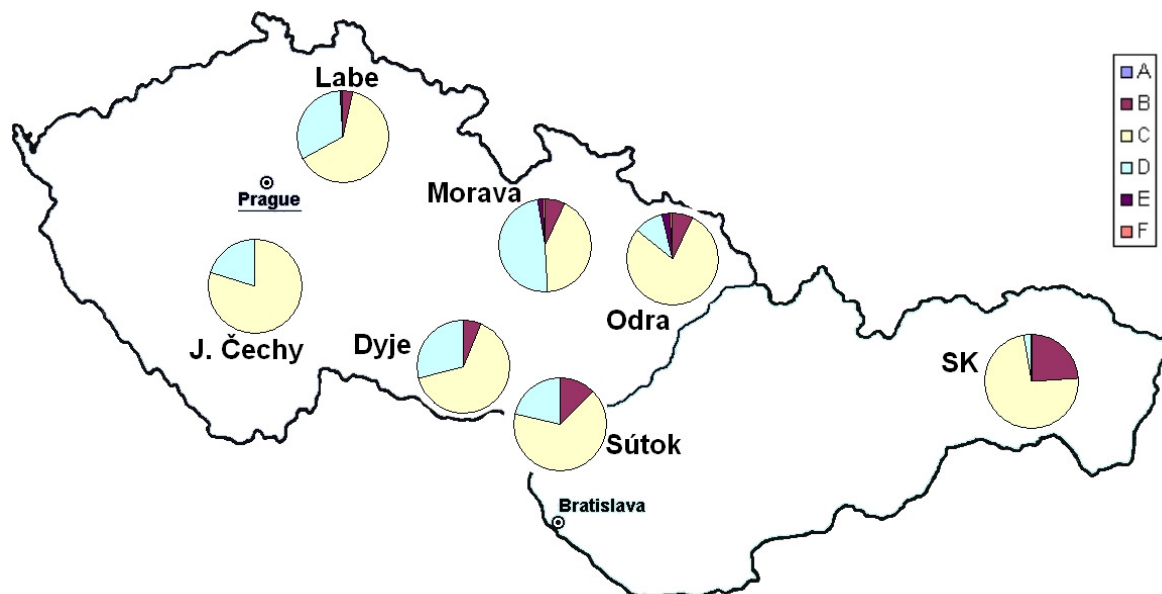
Lokus	veľkosť vzorky	<i>Daphnia curvirostris</i>			veľkosť vzorky	<i>Daphnia pulex</i>		
		F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}		F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
PGM	3068	0,1029	0,3647	0,2918	2528	-0,0799	0,1343	0,1983
PGI	3090	0,2651	0,5516	0,3898	2544	0,3331	0,6872	0,531
MPI	2986	0,2288	0,5541	0,4218	2388	0,1818	0,5938	0,5036
LDH	3078	0,2298	0,2926	0,0815	2538	0,7004	0,7077	0,0243
AO	3008	0,4291	0,654	0,3939	2532	0,603	0,7808	0,448
AAT	3086	0,198	0,4242	0,282	2464	0,0484	0,4077	0,3775
Priemer⁹	3053	0,2256	0,4931	0,3454	2499	0,189	0,5381	0,4305

Znázornením alelických frekvencií medzi povodiami (obr. 3 až 6) by mali byť viditeľné rozdiely v zastúpení aliel v jednotlivých povodiach v dôsledku obmedzenej disperzie cez hranice povodí a tým aj obmedzeného genetického toku. Exaktný test (testujúci nulovú hypotézu, že alelické frekvencie v povodiach sú rovnaké a nelíšia sa) by mal vyjsť signifikantne menší ako $\alpha=0,05$ a zamietnuť tak nulovú hypotézu.

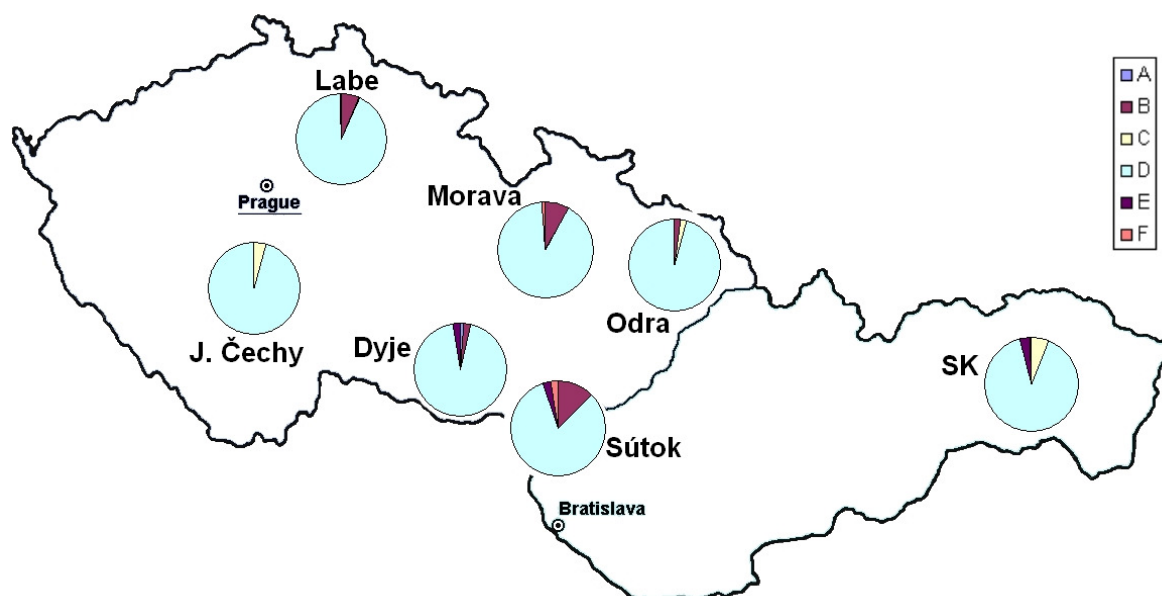
Populácie *D. pulex* a ani *D. curvirostris* zoskupené podľa príslušných povodí nevykazovali veľké rozdiely v zastúpení jednotlivých aliel. Vo všetkých povodiach boli na všetkých lokusoch prítomné rovnaké dominantné alely, líšili sa len vo svojej frekvencií výskytu. Len v povodí Morava bola u *D. pulex* na lokuse MPI frekvencia alely C nižšia ako 0,5 (0,41) na úkor alely D oproti ostatným povodiam (obr. 3). Na lokuse pre PGM boli rozdiely medzi povodiami ešte menšie, líšili sa len v zastúpení vzácných aliel (obr. 4). Ostatné lokusy vykazovali veľmi malú variabilitu medzi povodiami (nezobrazené dáta).

Výsledky exaktného testu z programu GENEPOP 1.2 (Raymond & Rousset, 1995), testujúceho zhodu alelických frekvencií medzi povodiami, vyšli pre oba druhy signifikantné (nezobrazené dáta). To znamená, že jednotlivé povodia sa medzi sebou líšia vo frekvenciách aliel. Podobne vyšli signifikantné rozdiely medzi povodiami aj v programe Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2005) - hladina signifikancie pre oba druhy bola menšia ako 0,001 (tab. 6). Rozdiely medzi povodiami však boli veľmi malé – približne 6 % u *D. curvirostris* a 11 % u *D. pulex*.

⁹ jedná sa o aritmetický priemer získaný z programu PopGene (Yeh et al., 1997)

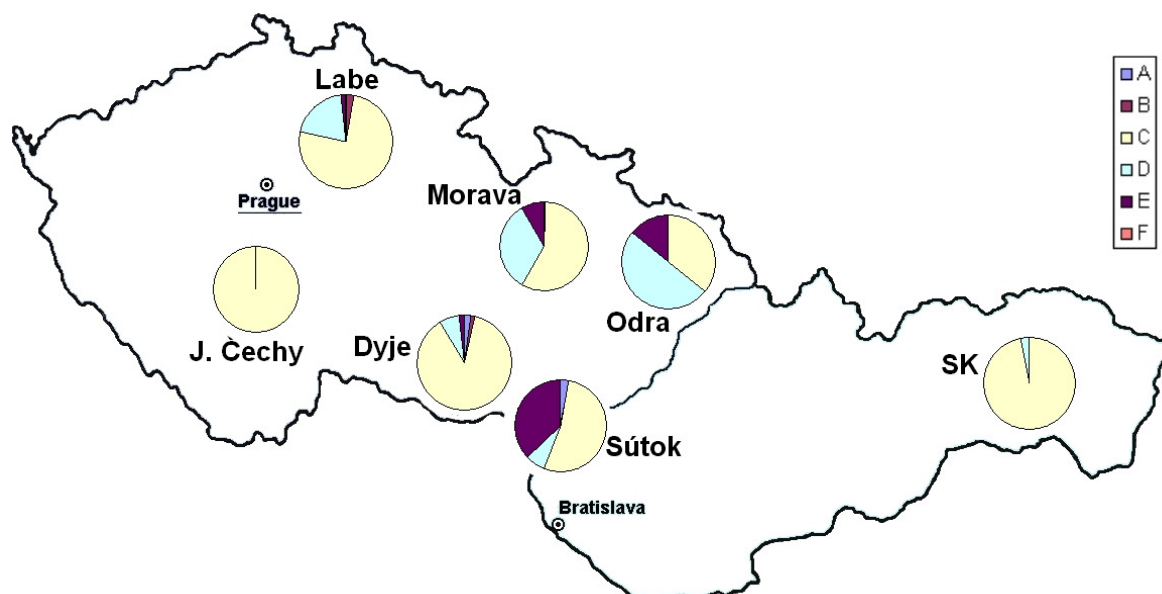


Obr. 3. Regionálne rozdiely v zastúpení aliel na lokuse MPI v jednotlivých povodiach u *D. pulex*.



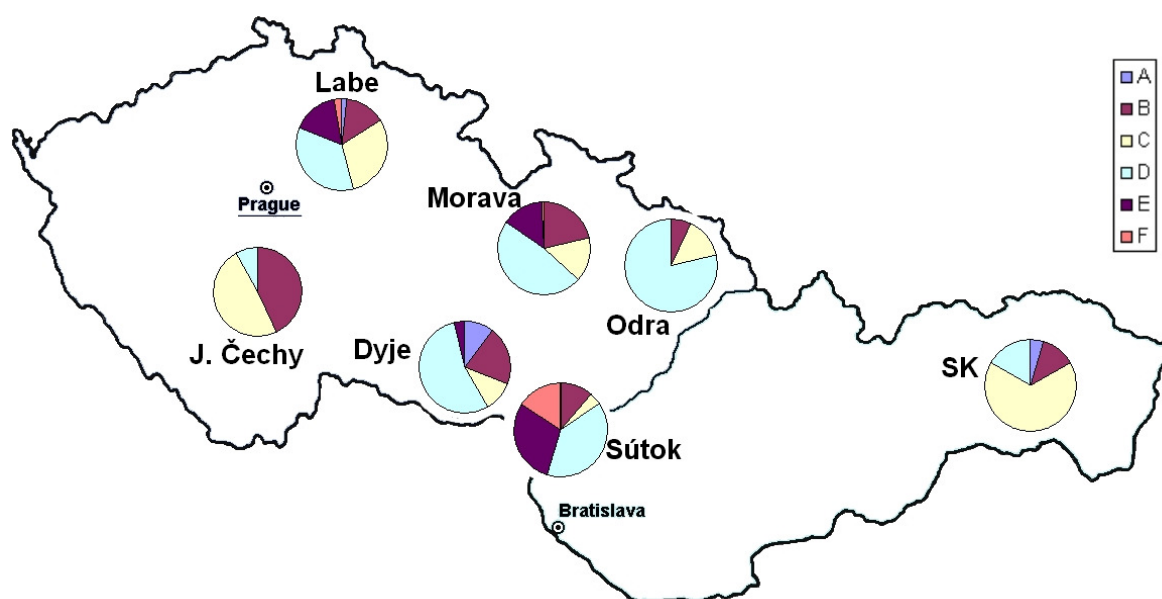
Obr. 4. Regionálne rozdiely v zastúpení aliel na lokuse PGM v jednotlivých povodiach u *D. pulex*.

U *D. curvirostris* bola variabilita medzi povodiami vyššia. Na lokuse pre PGI (obr. 5) je vidieť, že skupina Sútok a Odra majú nižšie zastúpenie dominantnej alely C a vyššie alely E ako ostatné skupiny. Skupina Odra je však zastúpená len jednou populáciou s počtom jedincov len sedem, takže tento výsledok môže byť skreslený. V skupine Sútok bola zaznamenaná alela E vo vyššej frekvencii v lokalitách SUT9, SUT12 a SUT13 (príloha tab. I-3).



Obr. 5. Regionálne rozdiely v zastúpení aliel na lokuse PGI v jednotlivých povodiach u *D. curvirostris*.

Ešte väčšia variabilita bola u tohto druhu zistená na lokuse PGM (obr. 6). Skupina Južné Čechy a Slovensko má oproti ostatným skupinám nižšie zastúpenie alely D a vyššie alely C.



Obr. 6. Regionálne rozdiely v zastúpení aliel na lokuse PGM v jednotlivých povodiach u *D. curvirostris*.

Analýza molekulárneho rozptylu by mala podľa našej hypotézy ukázať, že podstatná časť variability je prítomná medzi povodiami, ktoré predstavujú hranice pre pasívnu disperziu pomocou vody ako vektora. Naopak najmenšia časť variability by mala byť medzi populáciami v rámci jedného povodia, ako dôsledok prebiehajúceho genetického toku sprostredkovaného tokom.

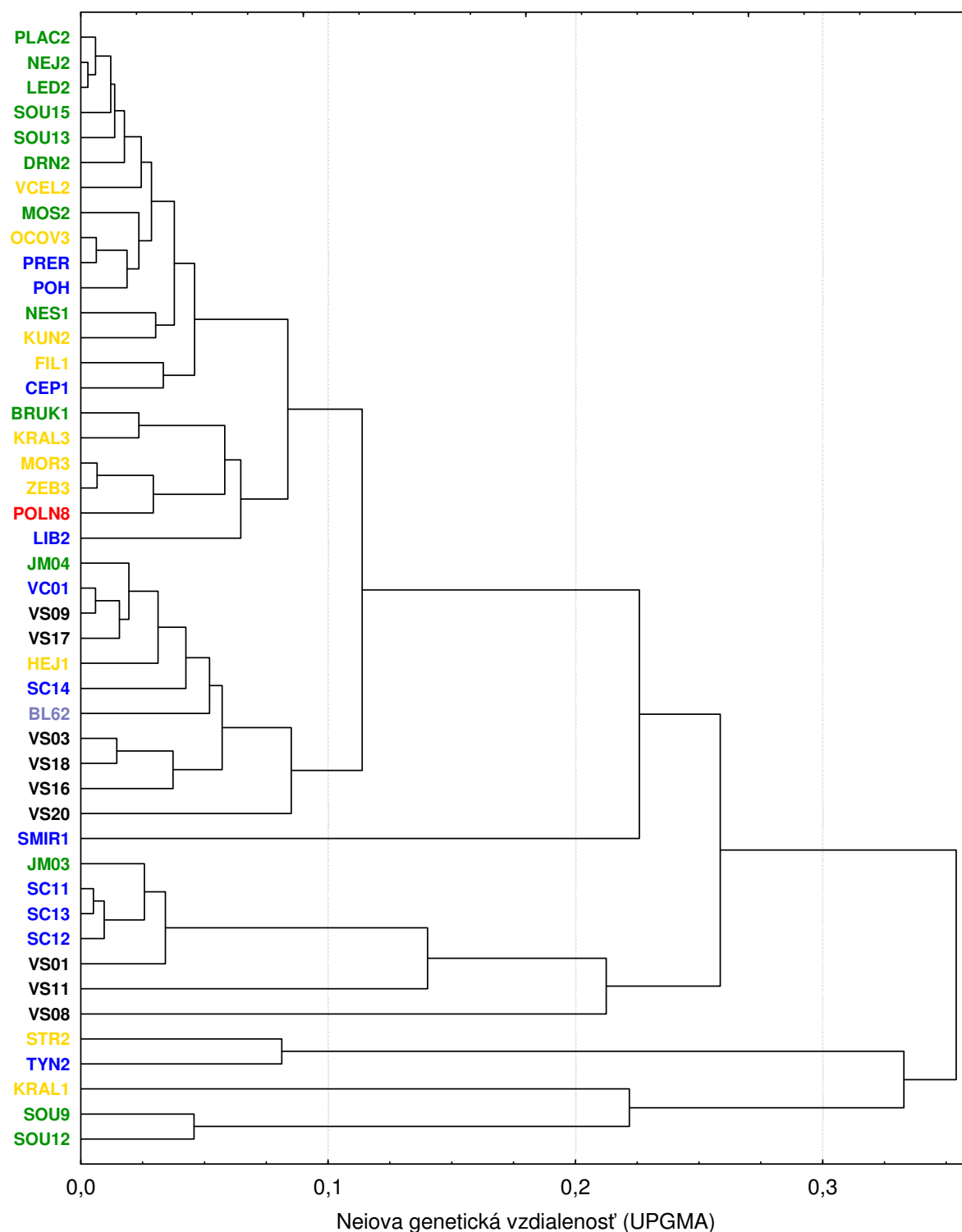
Výsledky AMOVA-y však ukázali, že najväčšia časť variability je prítomná v rámci lokálnych populácií (68 % a 70 %), menšia časť je prítomná medzi populáciami v rámci skupín povodí (26 % a 19 %) a najmenšia časť variability je medzi povodiami (6 % a 11 %). Všetky zložky rozptylu vyšli vysoko signifikantné (test signifikancie s 1023 permutáciami) (tab. 6).

Tab. 6. Výsledky hierarchickej analýzy molekulárneho rozptylu (AMOVA) medzi populáciami obidvoch druhov. Členenie do regiónov zodpovedá zaradeniu do skupín znázornenému v tab. 1 a 2. a približne zodpovedá členeniu podľa povodí. F-štatistika podľa (Weir & Cockerham, 1984).

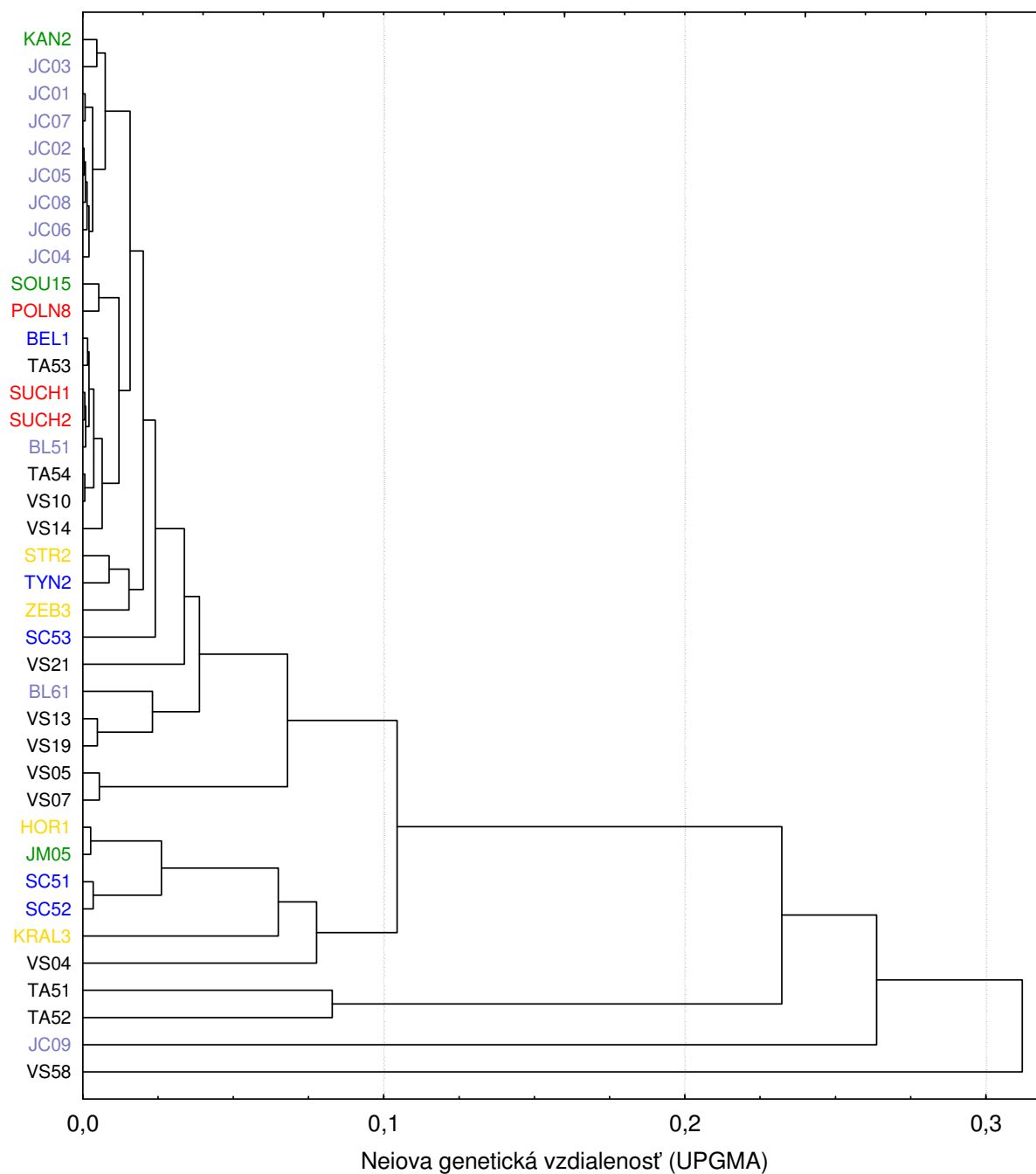
Zdroj variability	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Zložka rozptylu	Percentá odchýlky	Fixačné indexy	Hladina významnosti
<i>Daphnia curvirostris</i>						
medzi regiónmi	6	260,479	0,06111	6,13	F_{CT} = 0,06133	<0,001
medzi popul. v rámci regiónov	38	659,944	0,25782	25,88	F_{SC} = 0,27566	<0,001
medzi populáciami	3045	2062,867	0,67746	67,99	F_{ST} = 0,32009	<0,001
Spolu	3089	3019,291	0,99639			
<i>Daphnia pulex</i>						
medzi regiónmi	6	91,39	0,03308	11,09	F_{CT} = 0,11089	<0,001
medzi popul. v rámci regiónov	32	120,656	0,05696	19,09	F_{SC} = 0,21473	<0,001
medzi populáciami	2505	521,793	0,2083	69,82	F_{ST} = 0,3018	0,0127
Spolu	2543	733,84	0,29834			

Podľa našej hypotézy by mala byť Neiova genetická vzdialenosť medzi blízkymi populáciami a medzi populáciami v rámci jedného povodia menšia ako medzi populáciami z rôznych povodí. To by malo byť zrejmé z výsledného dendrogramu, kde sú populácie usporiadané podľa vzrastajúcej Neiovej genetickej vzdialenosti. Populácie v rámci jednotlivých povodí by mali byť zoskupené do klastrov a tieto klastre by mali približne zodpovedať povodiam. Ďalej by sme mohli predpokladať, že populácie z jedného povodia by mali byť približne usporiadané od hornej časti toku postupne dolu prúdom. Prúd vody by mal sprostredkovať aj genetický tok medzi populáciami a tie by si mali byť dole tokom stále viac a viac podobnejšie a tým aj genetické vzdialenosti medzi nimi by mali byť menšie.

Po vynesení Neiových genetických vzdialeností na dendrogram (obr. 7 a 8) je u oboch druhov vidieť, že populácie z jednotlivých povodí sa nezoskupili do vzájomne príbuznejších štruktúr, ale sú viac či menej premiešané s populáciami z iných povodí. Menšie zoskupenia sú viditeľné iba medzi niektorými geograficky veľmi blízkymi populáciami, medzi ktorými môže dochádzať k väčšiemu genetickému toku na takú krátku vzdialenosť, čo môže mať za následok väčšiu genetickú podobnosť populácií – napr. populácie JC (s výnimkou JC09) u *D. pulex* (obr. 8).



Obr. 7. UPGMA dendrogram všetkých 45 populácií druhu *Daphnia curvirostris* založený na Neiových genetických vzdialenostiach odvodených z alelických frekvencií všetkých šiestich skúmaných lokusov. Lokality sú označené farebne podľa skupín povodí: zelená – Dyje a sútok Moravy a Dyje, žltá – Morava, červená – Odra, modrá – Labe a Orlice, slabomodrá – Južné Čechy, čierna – Slovensko.



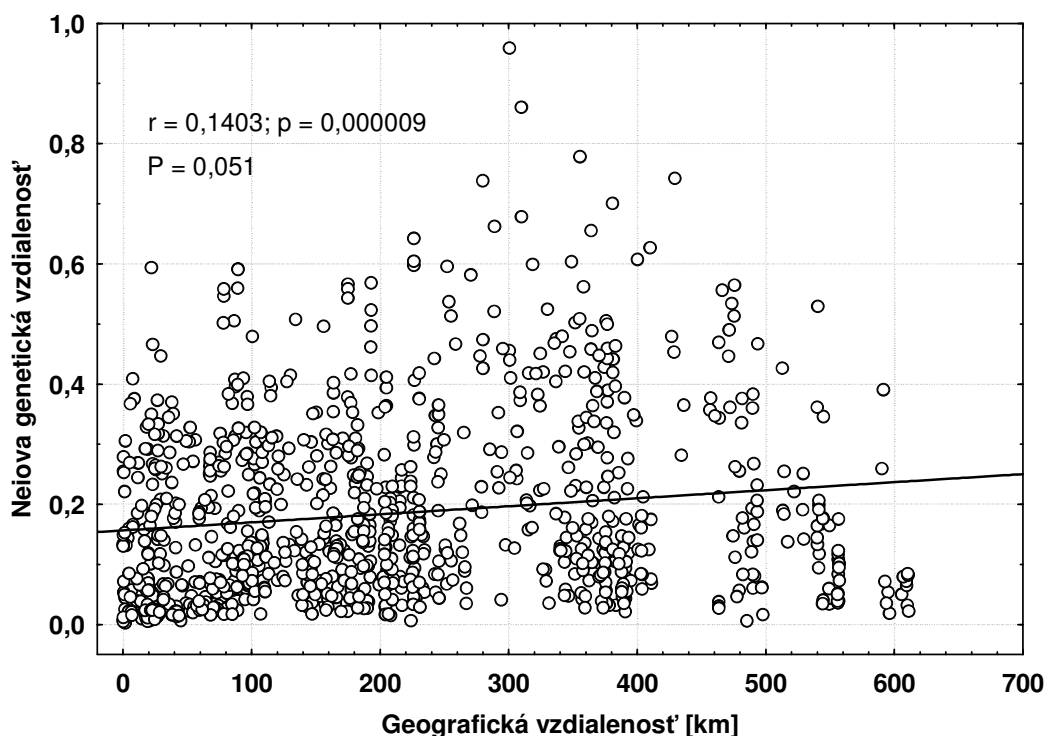
Obr. 8. UPGMA dendrogram všetkých 39 populácií druhu *Daphnia pulex* založený na Neiových genetických vzdialenostiach odvodených z alelických frekvencií všetkých šiestich skúmaných lokusov. Farebné označenie lokalít je rovnaké ako na obr. 7 vyššie.

Závislosť medzi genetickou a geografickou vzdialenosťou

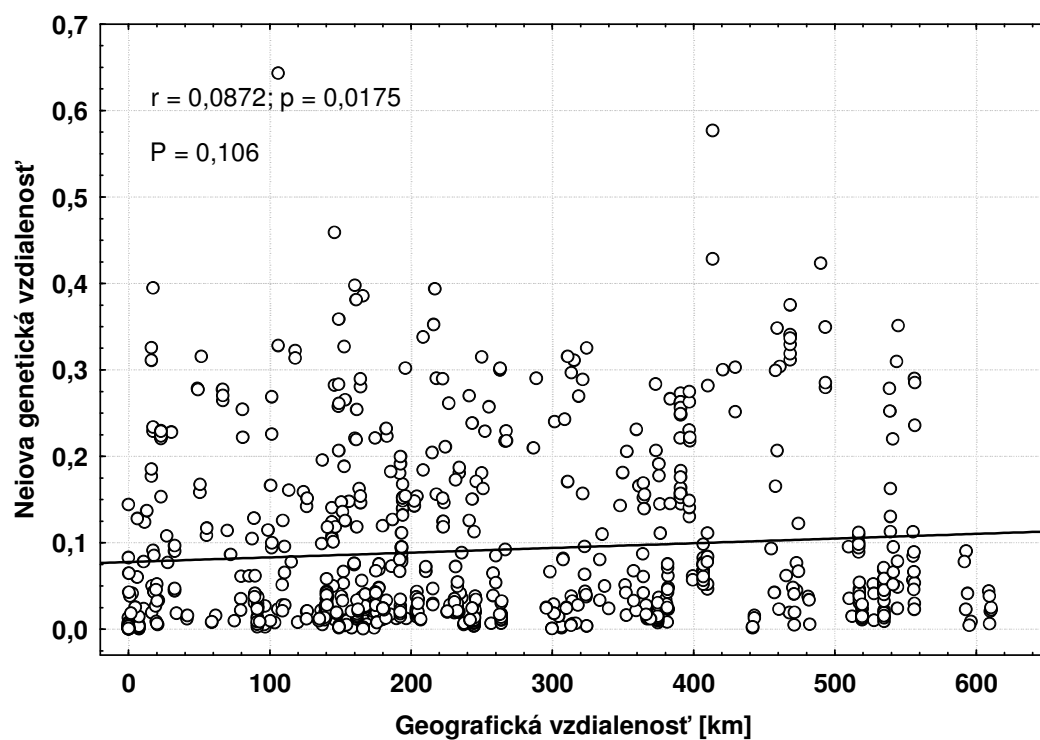
Z princípu našej testovanej hypotézy vyplýva, že ak sú populácie medzi sebou prepojené významnou disperziou, ktorá je nasledovaná genetickým tokom, potom by si mali byť tieto populácie geneticky podobnejšie. V prirodzených podmienkach predpokladáme pokles disperzie so vzrastajúcou geografickou vzdialenosťou. Tým by mala klesať aj homogenizačná sila

genetického toku a to by sa malo prejavíť na zväčšujúcej sa genetickej odlišnosti populácií so vzrastajúcou geografickou vzdialenosťou.

Vynesenie našich párových Neiových genetických vzdialeností proti párovým geografickým vzdialenostiam medzi populáciami viedlo u *D. curvirostris* len k slabej pozitívnej korelácii ($r=0,14$; $p<0,001$), ale Mantelov test (10 000 permutácií) vyšiel nesignifikantne ($P=0,051$), tesne nad hranicou signifikancie testu (obr. 9). U *D. pulex* bola korelácia medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou ešte slabšia ($r=0,0872$; $p=0,0175$) a výsledok Mantelovho testu vyšiel nesignifikantnejší ($P=0,106$) (obr. 10). Pravdepodobnou príčinou pozorovanej slabej závislosti bol príliš veľký rozptyl hodnôt. Príliš veľké genetické vzdialenosti aj medzi blízkymi populáciami sú viditeľné na obr. 9 a 10 a ťahajú počiatok krivky smerom nahor a tak rozmazávajú prípadnú závislosť. Veľké rozptyly hodnôt sú však zrejme pri všetkých geografických vzdialenostiach u oboch druhov, čo nasvedčuje, že je to systematický jav a nie výsledok náhody.



Obr. 9. Závislosť medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou u druhu *Daphnia curvirostris*.
 r – korelačný koeficient, p = hladina významnosti korelačného koeficientu, P – hladina významnosti Mantelovho testu.



Obr. 10. Závislosť medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou u druhu *Daphnia pulex*.
 r – korelačný koeficient, p = hladina významnosti korelačného koeficientu, P – hladina významnosti Mantelovho testu.

Diskusia

Táto predkladaná práca je prvou štúdiou zaoberajúcou sa genetickou variabilitou druhov *D. curvirostris* a *D. pulex* v kontexte regionálnej štruktúry riečnej siete na ploche väčšej ako stotisíc km² (ČR a SR). Česká republika poskytuje ideálne podmienky pre štúdium disperzie a genetickej variability medzi povodiami, lebo tu pramenia veľké európske rieky a jej územím prechádzajú hranice troch úmorí: Severného, Baltského a Čierneho mora. Hranice povodí tak predstavujú pre organizmy, ktoré migrujú vodným prúdom, ťažko prekonateľné bariéry. Preto by sa mala obmedzená disperzia medzi povodiami prejavovať hlavne na väčšej genetickej diferenciácii populácií z rôznych povodí. Za účelom splnenia cieľov tejto práce bolo analyzovaných 45 populácií druhu *D. curvirostris* a 39 populácií *D. pulex*, odobraných prevažne z dočasných vôd ležiacich spravidla v blízkosti tokov. Dočasné vody predstavujú pomerne nestále prostredie so špecifickými podmienkami, na ktoré sa adaptovalo len niekoľko organizmov. Je to biotop fragmentovaný, a preto sa dobre hodí pre štúdium disperzie, kolonizácie nových lokalít, genetického toku a genetickej variability medzi jednotlivými (meta-) populáciami. Pre testovanie našej hypotézy sme zvolili alozýmovú analýzu a analýzu variability na mtDNA. Výsledky analýzy mtDNA sú popísané a diskutované samostatne v nasledujúcej kapitole.

Enzýmová variabilita

Enzýmová variabilita bola u oboch druhov vysoká. Celkový počet aliel bol pre oba druhy veľmi veľký a vysoký bol aj stupeň polymorfizmu. To bolo spôsobené výberom variabilných enzýmov, ktoré vykazovali vnútrodruhovou alebo medzidruhovou variabilitu z pomerne rozsiahlych pilotných štúdií a literatúry (Černý, 1995; Černý & Hebert, 1999; Michels et al., 2003). Michels et al. (2003) vo svojej štúdií rozlíšili 19 aliel u *D. curvirostris* a 20 aliel u *D. pulex* na zodpovedajúcich enzýmoch. Nižší počet aliel v jeho práci mohol byť spôsobený menším počtom analyzovaných jedincov (457 u *D. curvirostris* a 662 u *D. pulex*), ako aj menšou plochou skúmaného územia (<200 ha). To mohlo spôsobiť, že niektoré vzácne alely s nízkou frekvenciou výskytu neboli odhalené alebo zo vzácných aliel mohli byť prítomné len lokálne, vyskytujúce sa v danej oblasti. Černý (1995) spracoval väčší počet jedincov (534 *D. curvirostris*, 916 *D. pulex*) na rovnakej ploche ako táto práca (ČR a SR) a aj počet pozorovaných aliel na zodpovedajúcich lokusoch bol väčší (24 u oboch druhov). Vyšší počet pozorovaných aliel v tejto práci (28, 26) mohol byť zapríčinený analýzou ešte väčšieho počtu jedincov (1545, 1272), ako aj rozdielmi pri subjektívnom skórovaní, spôsobenými napríklad použitím rôznych štandardov.

Pri porovnaní alelickej kompozície oboch druhov je vidieť, že najviac sa druhy líšili na lokuse LDH, kde je u každého druhu fixovaná iná alela. Tento gén sa využíva aj ako druhovo špecifický znak. Ostatné lokusy sa tak markantne nelíšili v prítomnosti aliel, líšili sa však vo frekvenciách ich výskytu. Podobné rozdiely v zastúpení dominantných aliel pozorovali Michels et al. (2003) na území Belgicka, kde zistili rýchlejšie dominantné alely u *D. curvirostris* na lokusoch MPI, LDH a AO a pomalšie na lokuse PGI v porovnaní s *D. pulex*, čo je v súlade aj s naším zistením.

V porovnaní s inými druhmi rodu *Daphnia* bola zistená genetická variabilita u skúmaných druhov vyššia, ale porovnateľná s druhmi obývajúcimi najmä dočasné habitaty.

Vysoká genetická diverzita mohla byť spôsobená typom habitatu, z ktorého boli populácie odoberané. Populácie z dočasných lokalít zvyčajne vykazujú vyššie hodnoty genetickej diverzity kvôli striedavému liahnutiu trvalých vajíčok, vzniknutých sexuálnym množením a uložených v banke propagulí, a kvôli pomerne krátkej dobe klonálneho množenia, spôsobenej krátkym časovým trvaním vhodných podmienok. Oproti tomu genetická diverzita populácií z permanentných lokalít je určovaná hlavne predĺženou dobou klonálnej selekcie počas partenogenetickej fázy reprodukcie, ktorá redukuje genetickú diverzitu (Hebert, 1987; Lynch & Spitze, 1994; De Meester, 1996). Väčšina našich populácií pre účely tejto práce bola odobraná z dočasných lokalít a na jar (apríl – máj), relatívne skoro po začatí obdobia rastu. Takže môžeme predpokladať, že väčšina jedincov pochádzala z vyliahnutých trvalých vajíčok vzniknutých sexuálnym množením, alebo že všetky populácie prešli porovnateľným počtom generácií partenogenetickej reprodukcie. U *D. pulex* boli odobrané aj populácie z permanentných lokalít (VS4, VS5, TA52, TA53, TA54, JC09) a môžeme si u nich všimnúť nízku diverzitu, typicky 2 až 6 klonov na celú populáciu. Klonálna selekcia u permanentných lokalít trvá dlhšiu dobu a môže byť veľmi účinná, lebo pôsobí na celý genóm ako na jeden celok (Lynch & Spitze, 1994; Vanoverbeke & De Meester, 1997). Vedie tak ku genetickej erózii a môže spôsobiť až kompletnú zmenu v zastúpení jednotlivých klonov za obdobie kratšie než tri mesiace (De Meester, 1996).

Zistená celková genetická variabilita u *D. curvirostris* bola väčšia ako u *D. pulex*. To môže byť spôsobené jej obmedzenejším výskytom oproti *D. pulex*, ktorá je považovaná za eurytopný druh, zatiaľ čo *D. curvirostris* je popísaná ako habitatový špecialista (Hebert, 1995). Pozorovaný vzťah tak môže odrážať existujúce ekologické rozdiely. Zatiaľ čo *D. curvirostris* sa v Strednej Európe typicky vyskytuje v dočasných habitatoch, *D. pulex* obýva aj permanentné habitaty, kde je predĺžené obdobie klonálneho množenia a jej genóm tak môže byť viac erodovaný. Navyše sú u tohto druhu známe populácie, ktoré sa rozmnožujú obligátnou partenogenezou, ktorá tiež redukuje genetickú diverzitu (Innes et al., 1986; Ward et al., 1994). Ďalším možným vysvetlením je, že v dávnej histórii tohto druhu nastalo niekoľko znížení populačných početností (bottleneck),

ktoré erodovali genetickú variabilitu u tohto druhu (Černý, 1995), čo sa mohlo odohrávať napríklad pri prežívaní malých populácií v refúgiách a ich následná expanzia pri striedaní glaciálnych a interglaciálnych cyklov počas pleistocénu (Hebert et al., 1989a).

Genetická variabilita v rámci populácií

Zistená genetická variabilita v rámci populácií bola pomerne vysoká. Oba druhy vykazovali vysoké percentá polymorfných lokusov (63 % *D. curvirostris*, 49 % *D. pulex*), čo však bolo spôsobené výberom variabilných lokusov, zistených v predchádzajúcich výskumoch, takže tento výsledok mohol byť skreslený. Väčšia vnútrapopulačná genetická variabilita bola pozorovaná u *D. curvirostris*, ktorá vykazovala vyšší priemerný počet aliel na lokus a s tým spojený aj väčší priemerný počet genotypov (MLG) na populáciu. Podobne zistil vyššiu genetickú variabilitu u *D. curvirostris* v porovnaní s *D. pulex* aj Černý (1995).

Pozorovaná priemerná heterozygotnosť bola u *D. curvirostris* 0,17 a u *D. pulex* 0,08, čo je veľmi podobná hodnota, ako zistil Černý (1995). Spitze (1993) udáva priemernú heterozygotnosť pre *D. obtusa* rovnú 0,12. Mort (1991) udáva hodnoty pre zooplanktón od 0,05 (pre litorálne druhy skupiny Cladocera) po 0,25 (pre Copepoda) s priemernou hodnotou rovnou 0,15. Zistené hodnoty heterozygotnosti sú porovnateľné aj s hodnotami u mnohých bezstavovcov (Nevo et al., 1983).

Vnútrapopulačná genetická štruktúra populácií skupiny Cladocera s cyklickou partenogézou závisí hlavne na permanentnosti habitatu, ktorá určuje frekvenciu sexuálnej reprodukcie generujúcu genetickú variabilitu a klonálnej reprodukcie znižujúcu genetickú diverzitu. Druhy z dočasných habitatov prechádzajú každú sezónu epizódou sexuálnej reprodukcie, ktorá vedie k vysokej klonálnej diverzite s genotypovými frekvenciami, ktoré sú v súlade s H-W rovnováhou a stabilné v čase (Hebert, 1974; De Meester, 1996). Tieto populácie vykazujú vysokú variabilitu na začiatku sezóny, keď dochádza k liahnutiu veľkého množstva jedincov z trvalých vajíčok vzniknutých sexuálnou reprodukciou, ktorá generuje genetickú variabilitu (Hebert, 1987; Lynch & Spitze, 1994; De Meester, 1996; Vanoverbeke & De Meester, 1997). Genetický polymorfizmus môže byť ďalej posilňovaný kontinuálnym prísunom nových genotypov vznikajúcich liahnutím z trvalých vajíčok počas sezóny (Hebert, 1987). Tento efekt býva ešte zosilnený u tých druhov, ktorých trvalé vajíčka prežívajú po mnoho rokov a môže tak dochádzať k reintrodukcii aliel, ktoré už medzitým boli selekciou z populácie odstránené (Hairston & DeStasio, 1988; Davies et al., 1997).

Populácie druhov z permanentných habitatov prechádzajú menej často obdobím sexuálnej reprodukcie a je u nich predĺžené obdobie klonálnej reprodukcie, a preto majú nízku klonálnu diverzitu a veľmi variabilné genotypové frekvencie (Hebert, 1987).

Zistené vysoké hodnoty vnútro populačnej genetickej variability tak zodpovedajú jednak typu habitatu, z ktorého boli dané populácie pre účely tejto práce odoberané (prevažne periodické vody), jednak adaptáciám na tento premenlivý biotop (sexuálna produkcia trvalých vajíčok, odolných voči nepriaznivým podmienkam a uložených v banke propagulí) a pomerne krátke obdobie klonálnej reprodukcie.

Hardy-Weinbergova rovnováha a rozmnožovací systém

V 10 populáciách *D. curvirostris* a 5 *D. pulex* bola pozorovaná signifikantná odchýlka od H-W rovnováhy, spôsobená u väčšiny populácií prevažne deficitom heterozygotov. Pritom genotypové frekvencie v populáciách s cyklickou partenogenezou z dočasných habitatov bývajú zvyčajne v súlade s H-W rovnováhou, lebo jedince sa na začiatku sezóny liahnu z trvalých vajíčok akumulovaných v sedimente a predstavujú produkt sexuálnej reprodukcie (Lynch, 1987; Hebert, 1987; Lynch & Spitze, 1994). Veľké odchýlky od H-W rovnováhy spojené s nízkym počtom genotypov sú typické pre obligátne partenogenetické populácie (Hebert et al., 1989b; Innes, 1991), zatiaľ čo populácie s cyklickou partenogenezou sa vyznačujú veľkým počtom genotypov (Hebert et al., 1989b; De Meester, 1996). Dáta z našich analyzovaných populácií dobre súhlasili s týmto tvrdením – väčšina populácií bola v H-W rovnováhe a až na výnimku CEP1 vykazovali populácie odlišné od H-W rovnováhy vysoké počty genotypov. U týchto populácií bola signifikantná odchýlka spôsobená pravdepodobne vysokou signifikanciou na niektorom lokuse, ktorá potom silno ovplyvnila aj výslednú pravdepodobnosť pre celú populáciu. To by mohli potvrdzovať aj výsledky ďalšieho spôsobu počítania odchýlok od H-W rovnováhy (GDR), u ktorého vyšli signifikantne odlišné len dve populácie CEP1 a SOU12. Veľmi nízka klonálna diverzita v populácii CEP1 (len dva genotypy na 44 jedincov) mohla byť skôr dôsledkom veľmi nízkeho stupňa polymorfizmu v tejto populácii ako obligátne partenogenetickej reprodukcie. To môže potvrdzovať aj výsledok exaktného testu na H-W rovnováhu, ktorý potvrdil, že alelické frekvencie na jedinom polymorfnom lokuse v tejto populácii sú v súlade s H-W rovnováhou. Jedine populácia SOU12 bola oboma spôsobmi označená za signifikantne odlišnú od H-W rovnováhy. Mala však veľký počet genotypov, preto signifikancia bola pravdepodobne spôsobená značným deficitom heterozygotov, ktorý mohol byť zapríčinený silným Wahlundovým efektom.

U väčšiny populácií signifikantne odlišných od H-W rovnováhy bol pozorovaný deficit heterozygotov. Je známe, že u populácií z dočasných habitatov sa deficit heterozygotov vyskytuje až na 15 % polymorfných lokusoch (Hebert, 1987). Ten môže byť spôsobený selekciou, nenáhodným krížením, príbuzenským krížením (inbreeding), alebo rozdelením populácie do subdivízií (Wahlund effect) (Brendonck et al., 2000; Lowe et al., 2004). Rozdiely v selekcii medzi

skúmanými lokalitami neboli študované, ale podmienky na lokalitách s deficitom heterozygotov sú zdanlivo rovnaké ako na ostatných, takže vplyv rôznej selekcie by mohol byť vylúčený. Nenáhodné kríženie nie je u skupiny Cladocera známe, preto ani toto vysvetlenie deficitu heterozygotov nie je pravdepodobné. Podobne príbuzenské kríženie nie je pravdepodobné u zooplanktónu s pretrvávajúcou bankou propagulí (Brendonck et al., 2000). Preto najpravdepodobnejším vysvetlením pozorovaného deficitu heterozygotov je Wahlundov efekt. Ten býva najčastejšie spôsobený premiešaním trvalých vajíčok z rôznych rokov a tak vyliahnutím jedincov z efípií rôznych generácií, ktoré reprezentujú klony s rozdielnou genetickou kompozíciou (De Meester, 1996; Brendonck et al., 2000). V roku 2006 postihli hlavne Moravu silné jarné povodne, ktoré mohli spôsobiť premiešanie banky propagulí v sedimente a následný Wahlundov efekt. Hlavne oblasti sútoku Moravy a Dyje boli zaplavené až do výšky jeden meter a lokality boli značne poničené prúdiacou vodou. To môže vysvetliť vysoký deficit heterozygotov pozorovaný v populácii SOU12 odobranej práve v oblasti sútoku Moravy a Dyje a práve v roku 2006.

Banka propagulí býva považovaná za adaptáciu na nepravidelné zaplavovanie v premenlivom prostredí a chráni tak druh pred vyhynutím na danej lokalite (Hairston, 1996). Liahnutie len malej časti vajíčok z banky propagulí býva považované za adaptáciu proti abortívnemu liahnutiu, ktoré je časté vo vysoko premenlivom prostredí (Brendonck, 1996; Simovich & Hathaway, 1997; Brendonck & Riddoch, 2000). Abortívne liahnutie prebieha po príliš krátkom zaplavení, ktoré nepostačuje na dokončenie životného cyklu a produkciu ďalšej generácie diapauzných štádií (Simovich & Hathaway, 1997; Philippi et al., 2001). Môže sa vyskytovať aj na nami skúmaných lokalitách, ktoré v suchších rokoch nemusia byť dostatočne zaplavené a vyschnú pred sexuálnou produkciou trvalých vajíčok.

Rozmnožovací systém odhadovaný na základe GDR vyšiel u väčšiny populácií ako cyklická partenogéza. V 9 populáciách *D. curvirostris* a 5 *D. pulex* však nemôžeme s istotou rozmnožovací systém potvrdiť, aj keď vysoké počty genotypov v týchto populáciách (s výnimkou CEP1) silno naznačujú cyklickú partenogézu. Ako obligátne partenogenetický spôsob reprodukcie vyšiel len v prípade SOU12 (je tam však veľký počet genotypov). Obligátne partenogenetický spôsob reprodukcie je známy u viacerých druhov dafnií a vyskytuje sa prevažne vo vyšších zemepisných a nadmorských výškach, ďalej v suchých oblastiach a v habitatoch s vysokou disturbanciou (Innes et al., 1991). V Európe udávajú Ward et al. (1994) hranicu medzi obligátnou a cyklickou partenogézou u *D. pulex* približne zodpovedajúcu 60° severnej šírky (obligátna partenogéza severne, cyklická južne od 60°). Obligátna partenogéza však bola pozorovaná u viacerých druhov dafnií aj v Strednej Európe (Černý, 1995).

Z uvedeného vyplýva, že všetky populácie sa pravdepodobne rozmnožujú cyklickou partenogenezou. Majú vo svojom rozmnožovacom cykle aj sexuálnu fázu, ktorá generuje väčšiu variabilitu, čo potvrdzuje jednak pozorovaný vysoký počet genotypov, jednak súlad väčšiny populácií s H-W rovnováhou, ktorá je charakteristická pre taxóny so sexuálnou reprodukciou.

Genetická diferenciácia medzi populáciami

Genetická diferenciácia medzi populáciami bola pre každý lokus vyjadrená pomocou Wrightovej F_{ST} štatistiky (Wright, 1965). Hodnoty F_{ST} pre jednotlivé lokusy kolísali pre oba druhy v rozmedzí od 0,02 po 0,53. Najväčšia hodnota u *D. curvirostris* bola 0,42 na lokuse pre MPI a u *D. pulex* 0,53 na lokuse pre PGI. Rôzne hodnoty diferenciácie medzi populáciami na jednotlivých lokusoch (vyjadrené ako F_{ST}) mohli byť pričítané pôsobeniu genetického driftu. Naznačujú tak stále pretrvávajúci efekt zakladateľa. Tento náhodný proces, vyskytujúci sa napríklad pri kolonizácii novej lokality malým počtom jedincov, čisto stochastickým spôsobom nastaví rôzny počet aliel s rôznymi frekvenciami pre každý lokus. Následný rýchly populačný rast do obrovských populačných početností typický pre populácie bezstavovcov zafixuje génové frekvencie vzniknuté počas kolonizácie a môže trvať až tisíce rokov, kým sa dané génové frekvencie erodujú (pretrvávajúci efekt zakladateľa) (Boileau et al., 1992). Z čisto stochastických dôvodov tak pravdepodobnosť fixovania danej alely na lokuse závisí na frekvencii výskytu tejto alely v populácii (Lowe et al., 2004). Tomuto vysvetleniu zodpovedá aj nami pozorovaný rozdiel v alelických frekvenciách medzi lokálnymi populáciami u oboch druhov, charakteristický aj pre iné dafnie. Veľkosť týchto rozdielov sa medzi lokusmi líšila. Slabo polymorfné lokusy vykazovali menšie rozdiely medzi populáciami ako vysoko polymorfné lokusy. U slabo polymorfných lokusov je totiž pravdepodobnosť, že si noví imigranti prinesú na novú lokalitu vzácnu alelu, nízka, zatiaľ čo u vysoko polymorfných lokusov, kde má viac aliel podobnú vyššiu frekvenciu výskytu, sú pravdepodobnosti prenosu rozdielnych aliel na nové lokality vyššie.

Pozorované odlišnosti v alelických frekvenciách na rôznych lokusoch aj medzi blízkymi populáciami tak silno naznačujú stále pretrvávajúci efekt zakladateľa.

Hodnota F_{ST} pre všetky lokusy (Weir & Cockerham, 1984) bola u *D. curvirostris* 0,320 a u *D. pulex* 0,301. To znamená, že genetická diferenciácia medzi populáciami u oboch druhov dafní bola podobná a stredne vysoká. Všeobecne viedli práce na ostatných skupinách taxónu Cladocera k podobným výsledkom. Typické hodnoty F_{ST} pre populácie zooplanktónu z rybníkov kolísajú v rozmedzí 0,250 až 0,790 (Innes, 1991; De Meester, 1996). Weider (1989) zistil podobný stupeň diferenciácie medzi 20 populáciami *Polyphemus pediculus* (Crustacea) medzi jazerami

vzdialenými od seba do 100 km. Priemerné hodnoty F_{ST} pre tri lokusy udáva 0,328. Hann & Hebert (1986) udávajú, že populácie rodu *Simocephalus* obývajúce rybníky vzdialené od seba do 100 km boli stredne diferencované pre druh *S. vetulus* ($F_{ST}=0,265$) a vysoko diferencované pre druh *S. serrulatus* ($F_{ST}=0,558$). Podobnú hodnotu $F_{ST}=0,291$ zistili Brendonck et al. (2000) medzi populáciami *Branchipodopsis wolffi* (Crustacea). De Melo & Hebert (1994) uvádzajú, že populácie druhu *Bosmina coregoni* z Európy a z oblasti Veľkých jazier sú menej diferencované (F_{ST} okolo 0,170) než populácie z vnútrozemia Severnej Ameriky, ktoré vykazujú väčšie rozdiely medzi populáciami ($F_{ST}=0,360$). Vysvetľujú to mohutným kontinuálnym prísunom imigrantov v balastnej vode prevažne z Európy do oblasti Veľkých jazier oproti menším počtom jedincov invadujúcich vnútrozemské jazerá, čo malo za následok silnejší efekt zakladateľa. Vysoké hodnoty F_{ST} (0,688 pre *Moina brachiata* a 0,575 pre *M. macrocopa*) uvádza Petrusek (2000). Vysoké hodnoty genetickej diferenciácie pripisuje taktiež prevažne pretrvávajúcemu efektu zakladateľa. Berg & Garton (1994) udávajú veľkú diferenciáciu medzi populáciami u druhu *Bythotrephes* (Crustacea) $F_{ST}=0,328$, ale s výnimkou pre populácie patriace k rovnakému povodiu, pre ktoré to je len $F_{ST}=0,021$. Vysvetľujú to tým, že riečne povodia pôsobia u tohto druhu ako migračné cesty, takže je tam významná disperzia medzi populáciami v rámci jedného povodia a slabá medzi populáciami z rôznych povodí.

Podobne aj v našej práci sme predpokladali významnú disperziu v rámci povodí, a preto boli jednotlivé populácie zaradené do skupín zodpovedajúcich približne povodiam. Keďže sa dá predpokladať, že disperzia trvalých vajíčok alebo aj aktívnych jedincov pri povodniach je obmedzená na riečny kanál, potom ako dôsledok dendritickej povahy riek a potokov by mala byť genetická diferenciácia minimálna medzi populáciami v rámci jedného povodia a väčšina genetickej diferenciácie by mala byť prítomná medzi populáciami z rozdielnych povodí (Meffe & Vrijenhoek, 1988). Zároveň sa dá predpokladať, že v dôsledku jednosmerného prúdenia tokov by mal byť aj vodou sprostredkovaný genetický tok prevažne jednosmerný, čo by malo mať za následok postupnú homogenizáciu populácií dole tokom, prípadne premiešanie na sútoku. Zároveň by sa podľa tohto predpokladu mohla vylúčiť možnosť pasívnej disperzie vodou medzi dvoma tokmi patriacimi k rôznym úmoriám. Česká republika poskytuje na overenie tejto hypotézy jedinečný dizajn, lebo tu pramenia veľké európske rieky a na jej území prebiehajú hranice troch úmorí – Severného, Baltského a Čierneho mora. Oproti tomu takmer celé územie Slovenska (až na malú časť odvodňovanú riekou Dunajec do Baltského mora) patrí do úmoria Čierneho mora. Kontakt sprostredkovaný tečúcou vodou medzi populáciami z ČR a SR je pre pasívnych disperzéroov veľmi nepravdepodobný, a preto boli všetky populácie zo Slovenska začlenené do jednej skupiny a využité viac-menej ako outgroup skupina. Podobného dizajnu ako táto práca

využila vo svojej štúdií Hughes (2007), ktorá takto porovnávala genetickú variabilitu populácií u rôznych skupín vodných bezstavovcov a rýb v kontexte regionálnej štruktúry riečnej siete. Zisťuje, že organizmy so životným cyklom obmedzeným na riečny kanál vykazujú vysoké hodnoty genetickej diferenciácie medzi populáciami z rozdielnych povodí, zatiaľ čo dobre dispergujúce organizmy, napríklad s lietajúcim dospelým štádiom, sú menej diferencované. Ďalej udáva, že najlepším disperzérrom cez hranice povodí je hmyz s lietajúcim dospelým štádiom a tomu zodpovedajú aj veľmi nízke hodnoty F_{ST} , kolísajúce okolo hodnoty 0,05. Ryby, mäkkýše a vodné kôrovce (Crustacea) vykazovali vysoké hodnoty F_{ST} (0,4 až 0,8) medzi populáciami z rozdielnych povodí a naznačujú veľmi obmedzený genetický tok. Podobne Berg & Garton (1994) pozorovali nižšiu genetickú variabilitu medzi populáciami druhu *Bythotrephes cederstroemi* (Crustacea) v rámci povodí a vysokú medzi populáciami patriacimi k rôznym povodiam. Vysvetľujú to významnou disperziou medzi populáciami v rámci jedného povodia a slabou medzi populáciami z rôznych povodí. No vnútrapopulačná variabilita bola u druhu *B. cederstroemi* malá, pravdepodobne v dôsledku kolonizácie len jedinou európskou populáciou, takže mohli byť viditeľné aj menšie rozdiely medzi populáciami, ktoré tak neboli prekryté vysokou vnútrapopulačnou variabilitou.

Výsledky našej analýzy molekulárneho rozptylu ukázali rovnako u oboch druhov, že najväčšia časť variability je prítomná medzi populáciami (68 a 70 %). Menšia časť je prítomná medzi populáciami v rámci skupín (povodí) (26 a 19 %) a najmenšiu časť variability z celkovej vysvetľuje úroveň skupiny (povodia) (6 a 11 %). Všetky zložky rozptylu boli vysoko signifikantné, čo znamená, že dané regióny sa skutočne medzi sebou líšia, no pozorovaný rozdiel medzi povodiami 6 a 11 % bol veľmi malý. Získaný výsledok z AMOVA-y je v rozpore s našou hypotézou a naznačuje, že efektívna disperzia v rámci povodí je obmedzená a nie je kľúčovým faktorom zodpovedným za utváranie genetickej štruktúry populácií. Takmer rovnaký výsledok u oboch druhov naznačuje, že vysvetlenie obmedzenej disperzie je potrebné hľadať v životných charakteristikách spoločných pre oba druhy a pôsobiach proti efektívnej disperzii. Týmito spoločnými charakteristikami môžu byť rozmnožovací cyklus a výskyt v rovnakých habitatoch – periodických vodách. Nami pozorovaný výsledok nie je úplne prekvapujúci, lebo k podobným výsledkom u druhu *Daphnia* dospel aj rad analýz. Tak Innes (1991) uvádza, že až 85 % genetickej variability je prítomnej vo vnútri populácií *D. pulex* v Severnej Amerike a 15 % variability je medzi populáciami. Michels et al. (2003) udávajú hodnoty 70-75 % medzi populáciami, 12-22 % medzi regiónmi a 8-12 % medzi populáciami v rámci regiónov. Podobne aj Crease et al. (1990) a Brendonck et al. (2000) zistili, že genetická diferenciácia medzi populáciami v rámci regiónov je vysoká v porovnaní s variabilitou medzi regiónmi. Vysoká genetická variabilita aj medzi blízkymi

populáciami nie je u rodu *Daphnia* neobvyklá a býva dokumentovaná už od počiatočných genetických výskumov u tohto rodu (Hebert, 1974; Korpelainen, 1984; De Meester, 1996).

Pozorovaná nízka variabilita medzi skupinami/regiónmi/povodiami je do značnej miery spôsobená vysokou variabilitou medzi populáciami. Variabilita medzi regiónmi je tak prekrytá variabilitou medzi populáciami a rozmazáva sa aj závislosť medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou. Preto treba hľadať príčiny nízkej variability medzi povodiami a slabej závislosti medzi geografickou a genetickou závislosťou na úrovni jednotlivých populácií. U druhu *Daphnia*, ako aj u iných druhov zooplanktónu, je známe, že aj susedné populácie sa môžu významne líšiť v alelických frekvenciách (Hebert, 1974; Korpelainen, 1984; Innes, 1991; Crease et al., 1990; Declerck et al., 2001). To je v súlade aj s naším pozorovaním, kde z výsledkov exaktného testu vykazovali všetky populácie u oboch druhov signifikantné rozdiely v alelických frekvenciách. Tento rozdiel však nebol systematický, naznačujúci nejaký trend, ale bol viac-menej náhodný. To znamená, že neboli pozorované žiadne významné rozdiely v zastúpení aliel v jednotlivých povodiach, naznačujúce oddelenie od ostatných skupín v dôsledku obmedzeného genetického toku cez hranice povodí, aj keď exaktný test alelických frekvencií medzi rôznymi povodiami vyšiel signifikantne. Pozorované rozdiely medzi povodiami však boli malé (6 a 11 %). V žiadnej skupine povodí nebola pozorovaná systematická prítomnosť aliel (napr. vzácných), charakteristických pre danú skúmanú oblasť povodia a nevyskytujúce sa v iných povodiach. Niektoré odchýlky boli spôsobené malým počtom jedincov pre danú skupinu (Odra *D. curvirostris*), ale častejšie veľkou variabilitou medzi populáciami v rámci skupiny, ktorá bola vysoká (26 a 19 %). Aj dendrogram Neiových genetických vzdialeností ukázal, že medzi niektorými populáciami patriacimi k rovnakému povodiu je genetická vzdialenosť veľká. Všeobecne sa jednotlivé populácie líšili hlavne v relatívnom zastúpení jednotlivých aliel a podľa toho boli potom hodnotené v rôznych štatistikách a zoskupené v dendrograme. Dendrogramy pre oba druhy taktiež ukazujú viac-menej náhodné zoskupenie populácií z rôznych povodí a rôzne medzi sebou vzdialených. Menšie zoskupenia sú viditeľné len u veľmi blízkych populácií, medzi ktorými môže prebiehať buď vyšší genetický tok, alebo to môže tiež odrážať kolonizáciu daných lokalít zo spoločného zdroja. Podobne pozorovali Crease et al. (1990) a Černý & Hebert (1993) len slabé rozdiely v alelických frekvenciách medzi regiónmi u niekoľkých druhov dafnií. Nízke makrogeografické rozdiely v alelických frekvenciách pozorovali aj Hebert et al. (1993) na území Spojených štátov amerických. Slabé rozdiely v alelických frekvenciách sú pripisované opäť na úkor značnej variability prítomnej na úrovni jednotlivých populácií. Genetické rozdiely medzi populáciami bývajú najčastejšie vysvetľované pretrvávajúcim efektom zakladateľa (Hebert, 1974; Hebert, 1987; Boileau et al., 1992; Berg & Garton, 1994; Boileau & Taylor, 1994), pulzujúcou selekciou

(temporary fluctuating selection) (Lynch, 1987) a lokálnymi adaptáciami (Mort & Wolf, 1986; De Meester, 1996).

Závislosť medzi genetickou a geografickou vzdialenosťou

Prvotné práce na druhu *Daphnia magna* nenašli žiaden vzťah medzi divergenciou populácií a vzdialenosťou, ale boli vždy obmedzené len na populácie z relatívne malej geografickej oblasti (Hebert, 1974). Fylogeografické štúdie s použitím alozýmov sú vhodnejšie na zisťovanie podobnosti populácií vo veľkej geografickej mierke, napríklad celých kontinentov (Hebert et al., 1993; Hebert & Finston, 1996), alebo na medzikontinentálne štúdie (Černý, 1995; Berg & Garton, 1994). No ani tieto práce nenašli jasný vzťah medzi vzdialenosťou a genetickou podobnosťou populácií.

V regionálnej mierke poskytuje lepšie rozlíšenie analýza mikrosatelitov, ale pri tak veľkom množstve analyzovaných jedincov ako v tejto práci je to metóda veľmi drahá. No aj práce s mikrosatelitmi uvádzajú vysokú variabilitu v rámci populácií (50-60 %) a najnižšiu časť variability medzi regiónmi (Pálsson, 2000).

Vzťah medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou vyšiel v tejto práci u oboch druhov nesignifikantne. Hoci je u *D. curvirostris* viditeľná slabá tendencia pre nárast genetickej diferenciácie s rastúcou geografickou vzdialenosťou, bol rozptyl hodnôt veľmi vysoký a sklon priamky veľmi nízky - Mantelov test vyšiel na hranici signifikancie 0,051. Podobne slabý korelačný vzťah ($r=0,28$; $p=0,04$) medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou medzi 11 populáciami *D. pulex* z dočasných rybníkov, vzdialených od seba 0 až 300 km, uvádza Innes (1991). Lynch & Spitze (1994) vo svojom prehľade zhrňujú dáta zo štúdií na rôznych druhoch a uvádzajú vzťah naznačujúci, že genetická diferenciácia medzi populáciami vzrastá so stúpajúcou maximálnou vzdialenosťou medzi študovanými lokalitami. Väčšina ich dát je však z lokalít vzdialených od 80 do 1000 km, takže tam nie sú zahrnuté blízke populácie, ktorých vysoká variabilita by mohla ovplyvniť pozorovaný vzťah. Pri štúdiách genetickej variability medzi populáciami *D. obtusa* v kontinentálnej škále v Severnej Amerike pozorovali Hebert & Finston (1996) posun v alelických frekvenciách na polymorfných lokusoch naprieč kontinentom, ale vzťah medzi geografickou vzdialenosťou a genetickou diferenciáciou nebol monotónny. Niektoré vzdialenejšie populácie si boli geneticky bližšie ako niektoré menej vzdialené.

Väčšina populačne genetických štúdií na neutrálnych markeroch uvádza, že vzťahy medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou sú v populáciách zooplanktónu slabé (Hebert, 1974; Boileau & Hebert, 1988; Innes, 1991; Boileau et al., 1992; Lynch & Spitze, 1994; De Melo &

Hebert, 1994; Weider et al., 1996; Vanoverbeke & De Meester, 1997). Slabý vzťah medzi geografickou vzdialenosťou a genetickou diferenciáciou býva často spôsobený veľkou genetickou diverzitou medzi blízkymi populáciami (Innes, 1991; Brendonck et al., 2000; Crease et al., 1990), než nedostatkom genetickej diverzity vzdialenejších populácií (Hebert et al., 1993; Weider et al., 1996; Crease et al., 1997). Vysoká genetická diverzita často aj medzi blízkymi populáciami môže odrážať buď pretrvávajúci efekt kolonizácie daných lokalít v minulosti malým počtom propagúl - efekt zakladateľa (Boileau et al., 1992; Louette et al., 2007), alebo nízky počet migrantov zo vzdialenejších populácií (Rousset, 1997). Efekt zakladateľa môže pretrvávať po mnoho generácií aj za podmienok značne prebiehajúceho genetického toku (Boileau et al., 1992; Louette et al., 2007). Podobne De Meester (1996) poukazuje na zjavný paradox u druhu *Daphnia* medzi rozsiahlymi lokálnymi adaptáciami a veľkým potenciálom pre pasívnu disperziu. Tento paradox môže byť vysvetlený kombináciou pretrvávajúceho efektu zakladateľa (Boileau et al., 1992) a relatívnej selektívnej výhody miestnych populácií, spojených spoločne do Monopolizačnej hypotézy (De Meester et al., 2002). Podľa tejto hypotézy dochádza vďaka vysokému potenciálu pre pasívnu disperziu k rýchlej kolonizácii nových habitatov často malým počtom propagúl, nezriedka len niekoľkými jedincami pochádzajúcimi z jedného efípia. Takto založená nová populácia môže mať často iné zastúpenie aliel než zdrojová populácia (Lowe et al., 2004). Po vyliahnutí z trvalých vajíčok nastáva obdobie rýchleho klonálneho rozmnožovania, ktoré stabilizuje frekvencie prítomných aliel (Boileau et al., 1992). Kvôli vysokej populačnej početnosti rezidentných jedincov je procesom genetického driftu eliminovaný vplyv neskorších imigrantov. Navyše dochádza ku koncu sezóny k založeniu obrovskej zásoby banky propagúl (egg bank) v sedimente, ktorá zabraňuje vyhynutiu populácie na danej lokalite, ale zároveň funguje aj ako účinný pufer proti novým imigrantom (Hairston, 1996). Vysoká odolnosť voči imigrantom tak vedie k nízkym hodnotám genetického toku. Rýchla adaptácia prítomných jedincov na lokálne podmienky ďalej selektívne znevýhodňuje neskorších imigrantov, prípadne ich potomkov, a tým znižuje ich dopad na genetickú štruktúru populácií (De Meester et al., 2002; Okamura & Freeland, 2002; Louette et al., 2007). Nedomchádza tak k očakávanému genetickému toku, ktorý by zodpovedal potenciálnemu genetickému toku odhadovanému na základe disperzných schopností. Následne tak nedochádza k homogenizácii alelických frekvencií, ale naopak k ešte väčšiemu posilneniu lokálnych adaptácií. V extrémnom prípade môže dôjsť ku genetickému odlíšaniu populácií prepojených občasnou výmenou vody a vzdialených od seba len päť metrov, ako vo svojej práci uvádzajú Declerck et al. (2001). Dokonca aj pri takej malej vzdialenosti dvoch lokalít ďalej uvádzajú, že genetické adaptácie na lokálne podmienky, posilňované silným pôsobením prírodnej selekcie zvyhodňujúcej lokálne genotypy, sú silnejšie ako potenciálny genetický tok,

podporovaný dobre dokumentovanými disperznými schopnosťami trvalých vajíčok. To naznačuje rozpor medzi potenciálnym a efektívnym genetickým tokom. Tak začínajúce adaptácie na lokálne podmienky postupne vedú k selektívnej výhode prítomných jedincov a k znevýhodňovaniu menej adaptovaných invadujúcich genotypov procesom kompetitívneho vylúčenia a procesom outbreeding depression (De Meester, 1996). K rovnakému záveru došiel rad analýz alozýmov a polymorfizmov DNA u taxónov sladkovodného zooplanktónu, ktoré zhodne ukazujú, že nie disperzia, ale efektívny tok génov medzi populáciami je nízky (Boileau et al., 1992; De Meester, 1996). Nižší než by plynulo z vysokého potenciálu pre tok génov vďaka transportu kľudových štádií (De Meester, 1996).

Z výsledkov tejto práce a z toho, čo už bolo diskutované, tak vyplýva, že nízka variabilita medzi povodiami a slabý vzťah medzi genetickou a geografickou vzdialenosťou sú spôsobené vysokou genetickou variabilitou na úrovni jednotlivých populácií. Pozorovaná vysoká genetická variabilita populácií je spôsobená pretrvávajúcim efektom zakladateľa a adaptáciami na lokálne podmienky. Tie pôsobia proti disperzii a účinne znižujú genetický tok medzi populáciami a zabráňujú tak zmene alelických frekvencií, ustanovených pri kolonizácii danej lokality v minulosti.

To je v našom prípade ešte umocnené dočasnou habitatom, v ktorých sa oba druhy vyskytujú, a z ktorých boli aj prevažne odoberané. Populácie organizmov obývajúcich dočasné habitaty sa totiž vyznačujú vysokou genetickou diverzitou a relatívne stabilnými genotypovými frekvenciami, ktoré sú v súlade s H-W rovnováhou (Hebert, 1974; Crease et al., 1990; De Meester, 1996). Genetická štruktúra týchto populácií je preto určená hlavne striedaním fázy sexuálnej a klonálnej reprodukcie a významne sa nelíši od obligátne sexuálnych populácií (Hebert, 1987). Sexuálna reprodukcia je jedným z hlavných zdrojov genetickej diverzity. Procesom rekombinácie a segregácie tak môže vznikať viac genotypov, ktoré ale môžu byť počas nasledujúcej periódy asexuálnej reprodukcie vystavené klonálnej selekcii (Michels et al., 2003; Louette et al., 2007). Pretože dočasné habitaty pomerne rýchlo vysychajú, doba klonálnej reprodukcie je krátka a zvyčajne neprevyšuje 5-10 generácií (Lynch, 1987). Relatívne rýchly vývoj vzniku a zániku procesom zazemňovania a riečnej erózie a krátka doba existencie týchto habitatov v porovnaní s permanentnými (napr. jazerami) spôsobujú vyššiu frekvenciu extinkcie a rekolonizácie na týchto biotopoch (Havel et al., 2000). Fakt, že nová populácia býva pravdepodobne založená malým množstvom jedincov (propagulí), pri ktorom dochádza k efektu hrdla fľaše (bottleneck), môže tiež prispievať k diferenciácií medzi populáciami žijúcimi v týchto periodických habitatoch (Crease et al., 1997). Rozdiely v génových frekvenciách, spôsobené kolonizáciou lokality malou skupinou

jedincov a umocnené rýchlym klonálnym množením, tak môžu aj pri pôsobení genetického toku pretrvávajú po tisíce generácií (Boileau et al., 1992; Boileau & Taylor, 1994).

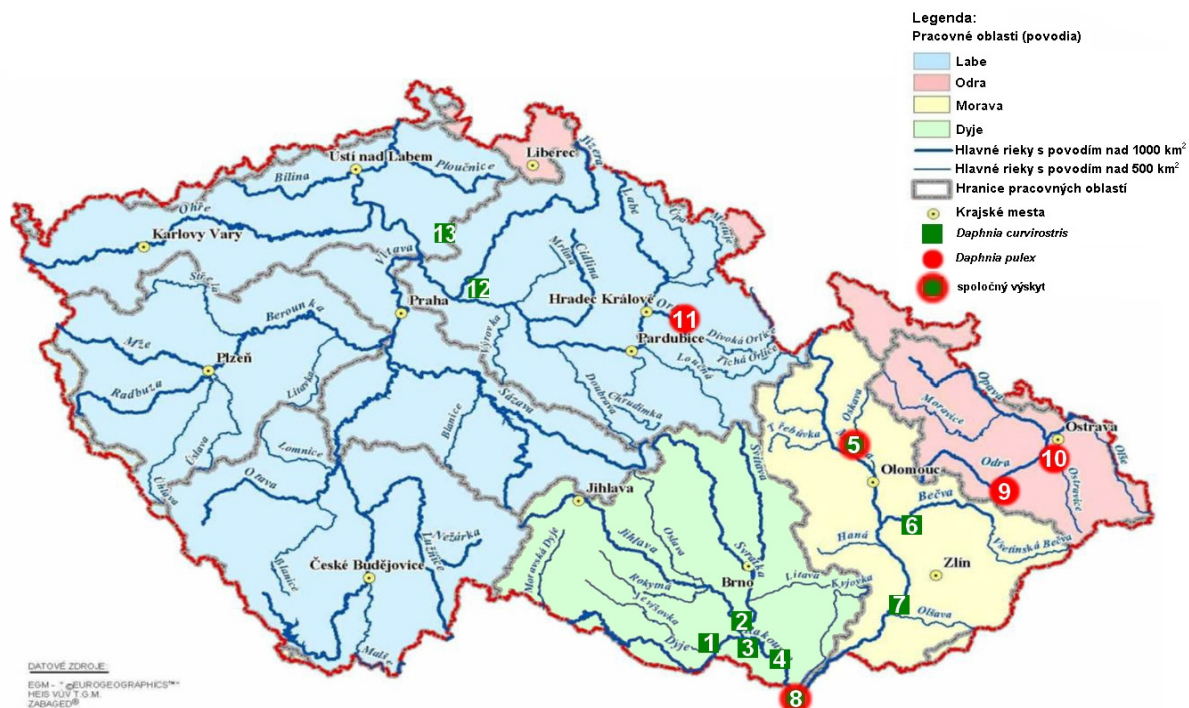
Na tvorbe genetickej variability u oboch druhov sa tak podieľajú hlavne lokálne procesy (rýchla adaptácia na lokálne podmienky, sexuálna produkcia trvalých vajíčok), spôsobené adaptáciami na veľmi špecifické podmienky periodických vôd, a historické vplyvy - efekt priority, sprostredkovaný existujúcou bankou propagulí. Disperzia hrá významnú rolu len pri kolonizácii nových stanovišť a jej vplyv na genetickú variabilitu už osídlených stanovišť je minimálny, čo odporuje našej pracovnej hypotéze a preto ju môžeme zamietnuť.

Analýza DNA

Pre testovanie našej hypotézy boli odoberané prevažne lokality ležiace v blízkosti riek, kde sa dá predpokladať, že pri vyšších hladinách vody sú prepojené s tokom a môže tak dochádzať k prenosu trvalých vajícok a následne ku genetickému toku. Tieto lokality však zároveň predstavujú extrémny biotop - sú nepravidelne zaplavované v závislosti na hydrologických podmienkach a väčšiu časť roka sú vyschnuté. Zároveň majú pomerne rýchly vývoj vzniku a zániku. Preto je u organizmov, ktoré sa tu vyskytujú, zvýšená frekvencia extinkcie a rekolonizácie (Havel et al., 2000). Skutočnosť, že nové populácie bývajú často založené malým počtom jedincov, tak prispieva k väčšej diferenciácii medzi týmito lokalitami (Louette et al., 2007). Kolísanie populačných početností a rozdelenie populácií do podskupín (dém) s obmedzenou migráciou nemá rovnaký vplyv na distribúciu variability v jadrovom a v mitochondriálnom genóme. Kvôli dedičnosti mitochondrií len po materskej línii a ich predávaniu potomkom aj pri klonálnom rozmnožovaní predstavuje efektívna veľkosť populácie pre mitochondriálne gény len približne jednu štvrtinu oproti génom uloženým v jadre. Tak pri rovnakej mutačnej rýchlosti a intenzite selekcie preto môžeme predpokladať u mitochondriálnych génov väčšiu variabilitu medzi démami, medzi ktorými je obmedzená migrácia, a menšiu v rámci dém, v porovnaní s génmi kódovanými v jadre (Crease et al., 1990). Preto sa analýza mitochondriálnych génov lepšie hodí na zisťovanie medzipopulačnej variability medzi skupinami s obmedzenou migráciou. V našom prípade môžu predstavovať skupiny s obmedzenou migráciou povodia, medzi ktorými predpokladáme viac obmedzený genetický tok. Lenže mitochondriálne gény sa nedajú použiť na testovanie hypotézy v zmysle, že jednotlivé haplotypy v rámci povodí sú vzájomne príbuznejšie ako iné – to by sme testovali hypotézu, či došlo k diverzifikácii génu až po osídlení jednotlivých povodí (a to nie je veľmi pravdepodobné). Dajú sa však dobre využiť na sledovanie rozmiestnenia jednotlivých haplotypov v krajine, čo môže napovedať o postupe kolonizácie daných lokalít, a aj prebiehajúceho genetického toku. K tomu je ale potrebné mať osekvenovaných niekoľko jedincov z každej populácie.

Lokality

Podrobný popis odoberania a spracovania vzoriek je uvedený v kapitole Materiál a metódy. Vzorky boli odoberané z lokalít spoločne pre alozýmovú aj DNA analýzu, ale kvôli inému systému kódovania vzoriek pre analýzu DNA a pre lepšiu prehľadnosť sú lokality, ktoré boli sekvenované, znázornené samostatne na obr. 11. a uvedené v tab.7.



Obr. 11. Mapa odberových miest, z ktorých boli vzorky sekvenované pre analýzu DNA. Podrobnejší popis je v legende obrázku.

Tab.7. Zoznam lokalít a odberových miest použitých pre analýzu DNA. P – povodie, do ktorého bola lokalita zahrnutá pri analýze: D – Dyje, M – Morava, S – sútok Moravy a Dyje, O – Odra, L – Labe; Druh: C – *Daphnia curvirostris*, P – *D. pulex*; Mapa – číslo, ktoré na obr. 11 znázorňuje polohu lokality na mape.

Názov lokality	Oblasť, povodie	Kód	P.S.	Druh	Mapa	Zemepisná šírka	Zemepisná dĺžka	Dátum odberu
Drnholecký luh 2	Podyje (Pálavsko)	DRN2 11	D	C	1	48°50'24"N	16°29'03"E	28.3.2007
Mošovský luh 2	Podyje (Pálavsko)	MOS2 25	D	C	2	48°54'35"N	16°35'24"E	28.3.2007
Plačkov les 2	Svratka nad vod.d. Nové Mlýny	PLAC2 20	D	C	2	48°56'54"N	16°35'59"E	28.3.2007
Lednice 1	Podyje (Lednicko)	LED1	D	C	3	48°48'23"N	16°50'06"E	28.4.2006
Kančí obora 4	Podyje (Břeclavsko)	KAN1	D	C	4	48°48'07"N	16°50'13"E	29.3.2007
Moravičany 3	CHKO Litovelské Pomoravie	MOR3 11	M	C	5	49°45'02"N	17°00'19"E	02.4.2007
Hejtmanka 1	CHKO Litovelské Pomoravie	HEJ1	M	C	5	49°42'41"N	17°01'26"E	02.4.2007
Kunovický les 2	Pomoravie (Uherské Hradiště)	KUN2 13	M	C	7	49°03'40"N	17°26'31"E	31.3.2007
Žebračka 3	Povodie Bečvy	ZEB3	M	C	6	49°28'20"N	17°27'21"E	01.4.2007
Soutok 15	Sútok Moravy a Dyje	SOU15 10	S	C	8	48°37'53"N	16°57'14"E	30.3.2007
Soutok 13	Sútok Moravy a Dyje	SOU13 20	S	C	8	48°41'36"N	16°57'10"E	30.3.2007
Kokořínsko	CHKO Kokořínsko	KOK	L	C	13	50°27'23"N	14°28'28"E	18.4.2006
Libický luh 2	Polabie Středné Čechy	LIB2 3	L	C	12	50°06'07"N	15°10'49"E	21.4.2007
Hejtmanka 1	CHKO Litovelské Pomoravie	HEJ1 12	M	P	5	49°42'41"N	17°01'26"E	02.4.2007
Soutok 15	Sútok Moravy a Dyje	SOU15 1	S	P	8	48°37'53"N	16°57'14"E	30.3.2007
Suchdol 1	CHKO Poodří	SUCH1A	O	P	9	49°38'56"N	17°57'41"E	25.4.2006
Suchdol 1	CHKO Poodří	SUCH1B	O	P	9	49°38'56"N	17°57'39"E	25.4.2006
Polanská niva 8	CHKO Poodří	POLN8 4	O	P	10	49°45'49"N	18°11'04"E	03.4.2007
Běleč 1	Orlice	BEL1 4	L	P	11	50°12'04"N	15°55'04"E	13.4.2007

Izolácia DNA

Zo zvolených lokalít bolo pre analýzu DNA vybraných 2 až 6 celých jedincov fixovaných pre tento účel v 96% etanole a izolácia DNA sa robila aj z homogenátu 3 až 6 jedincov určených aj na alozýmovú analýzu. Z dôvodu uchovávanía vzoriek v etanole boli najprv samostatné jedince prevedené na dobu dve hodiny do destilovanej vody pri laboratórnej teplote, aby došlo k vyplaveniu etanolu, ktorý by mohol znížovať účinnosť následnej izolácie DNA. Potom boli jedince prenesené do samostatných mikroskúmaviek s 50 µl roztoku proteinázy K. Vzorky z homogenátu pre alozýmovú analýzu, v množstve cca 5 µl, boli prevedené priamo do roztoku proteinázy K. Zloženie izolačného roztoku vychádzalo z práce Schwenk et al. (1998) a malo nasledujúce zloženie: 300 µl homogenizačný pufer; 10 mM Tris-HCl - pH 8,3 pri 25 °C; 0,05 M KCl; 0,005% Tween-20; 0,005% NP-40; Replitherm Reaction Buffer, Biozym a 15 µg proteinázy K. Tento roztok bol vopred pripravený laborantkou a uchovávaný pri -15 °C.

Samotná izolácia prebiehala v heatblock-u po dobu 12 hodín pri teplote 57 °C (optimum pre činnosť proteinázy). Po uplynutí tejto doby boli vzorky denaturované pri teplote 95 °C po dobu 10 minút v termocykleri a potom skladované pri teplote 4 °C.

Amplifikácia génu COI

Primárne mala táto práca zistiť variabilitu na mitochondriálnom géne cytochróm-c-oxidáza podjednotka I (COI) s približnou dĺžkou 650 bp. COI je gén pomerne konzervatívny, využíva sa preto napr. na zistenie distribúcie haplotypov u organizmov, ktoré majú obmedzené disperzné schopnosti medzi geograficky oddelenými štruktúrami (Rychtmocová, 2008), ďalej u organizmov vo veľkej geografickej mierke, napríklad medzikontinentálne štúdie (Cox & Hebert, 2001), alebo na rozlíšenie kryptických druhov (Rowe et al., 2007).

Po veľmi malom počiatočnom úspechu s použitím univerzálneho COI primeru pre Metazoa (Folmer et al., 1994): LCO-1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') a HCO-2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') a štandardného protokolu podľa Schwenk et al. (2000) (úvodná denaturácia pri 94 °C po dobu 3 minút, nasledovalo 40 cyklov pri teplotách: 94 °C – 1 min., 40 °C – 1,5 min., 72 °C – 1,5 min., záverečná extenzia: 72 °C po dobu 6 minút) boli najprv skúšané rôzne modifikácie v teplote nasadenia primerov a v zložení reakčnej zmesy, nakoniec bola vyskúšaná aj zmes nepublikovaných degenerovaných primerov navrhovaných špeciálne pre kôrovce (Dirk Steinke, nepubl.).

Amplifikácia génu 12S srRNA

Po pomerne rozsiahlych neúspešných pokusoch o amplifikáciu génu pre COI sme sa rozhodli amplifikovať viac konzervatívny mitochondriálny gén pre 12S srRNA s približnou dĺžkou 600 bp. Reakčná zmes bola pripravená v celkovom objeme 20 µl a mala nasledujúce zloženie (v zátvorke sú uvedené koncentrácie danej látky v zásobnom roztoku): 10,8 µl prečistená destilovaná voda, 2,0 µl 10x PCR pufor, 1,6 µl MgCl₂ (25mM), 1,5 µl dNTPs (2mM), 0,8 µl primer 12S-F (10 µM), 0,8 µl primer 12S-R (10 µM), 0,5 µl Taq polymeráza (1U/µl), 2 µl extrahované DNA. Použité primery (Taylor et al., 1996; Schwenk et al., 2000) mali nasledujúce sekvencie: 12S-F (5'-ATG CAC TTT CCA GTA CAT CTA C-3') a 12S-R (5'-AAA TCG TGC CAG CCG TCG C-3'). PCR reakcia prebiehala v mikroskúmavkách s objemom 0,2 ml v pásoch po 8 (stripov) na termocykleri iCycler Thermal Cycler (BIO-RAD). Použitý bol protokol s nasledujúcim programom: úvodná denaturácia pri 97 °C po dobu 3 minút, nasledovalo 40 cyklov pri teplotách: 92 °C – 1 min., 54 °C – 1 min., 72 °C – 1,5 min., záverečná elongácia: 72 °C po dobu 5 minút a vychladenie na 10 °C.

Úspešnosť PCR reakcie bola zisťovaná horizontálnou elektroforézou (Gibco BRL Horizontal Gel Elektrochoreisis Apparatur) v roztoku s pufrom TBE na 1,5% agarózovom géle s 1,5 µl EtBr. Elektroforéza prebiehala 30 minút pod napätím 180 V a prúdom 500 mA. Na gél sa nanášalo 1,5 µl PCR produktu zmiešaného s nanášacím pufrom (loading buffer). Dĺžka amplifikovaných fragmentov bola porovnávaná so štandardom Mass Ruler DNA Ladder (100 bp), Low Range. Po zviditeľnení fragmentov v UV svetle sa pre archiváciu spravila digitálna snímka.

Amplifikácia génu NADH-2 (ND2)

Po úspechu s amplifikovaním génu pre 12S sme siahli po ďalšom mitochondriálnom, proteín kódujúcom géne s pomerne rýchlym evolučným vývojom: nikotínamid-adenín-dinukleotid-dehydrogenáza podjednotka 2, NADH-2 dehydrogenáza, (ND2) s približnou dĺžkou 965 bp. Najprv boli použité cyklus a primery opísané v Ishida et al. (2006): MetF1 (5'-TAA AGC TAG TGG GTT CAT GCC CC-3'), MetF2 (5'-TGG GTT CAT GCC CCA TTT ATA G-3'), MetF3 (5'-GTT CAT GCC CCA TTT ATA GGT TA-3'), CysR (5'-AGT TGA AAA GAG TCA ACG TCG CA-3') a TrpR (5'-GAA GGT TTT TAG TTT AGT TAA CTT AAA ATT CT-3'). Program PCR reakcie bol nasledujúci: úvodná denaturácia pri 94 °C po dobu 3 minút, nasledovalo 40 cyklov pri teplotách 94 °C – 45 s, 48 °C – 45 s, 72 °C – 1,5 min., záverečná elongácia pri 72 °C po dobu 5 minút a vychladenie na 10 °C. Najprv sme s pomerne slabým úspechom použili primery MetF3, TrpR, doporučené pre túto skupinu dafnií (Ishida et al., 2006). Potom sme postupne vyskúšali všetky kombinácie primerov aj ich spoločný mix a skúsili sme manipulovať aj s koncentraciami

jednotlivých reakčných zložiek a nasadacích teplôt PCR reakcie. Stále sa nám však nepodarilo amplifikovať jedincov z niektorých populácií. Preto sme po sekvenácii časti vlastných vzoriek a s použitím sekvencie ND2 jednej americkej (číslo GenBank DQ132619) a jednej európskej (DQ132620) *D. curvirostris* (zdroj <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) siahli po vytvorení vlastných vnútorných primerov na vysoko konzervatívnych častiach génu pre ND2: ND2CurF110 (5'-ATT TCT CCC CCT CCT GCT T-3'), ND2CurF189 (5'-GCC TCC GTC ATC GTA GTA G-3') a ND2PulF186 (5'-TAC TCA AAC CCT GGC CTC AG-3'). Pri vytváraní primerov sme použili programy Primer3 - <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3www.cgi> a FastPCR - <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>. Takto nami vytvorené nové primery však pri použití štandardného protokolu nasadali aj na iné časti genómu, čo viedlo k tvorbe rôzne dlhých fragmentov. Pre hľadanie optimálnej nasadacej teploty sme použili gradient teplôt od 49 do 63 °C. Pri ešte vyššej teplote už PCR reakcia neprebiehala.

Spracovanie sekvencií DNA

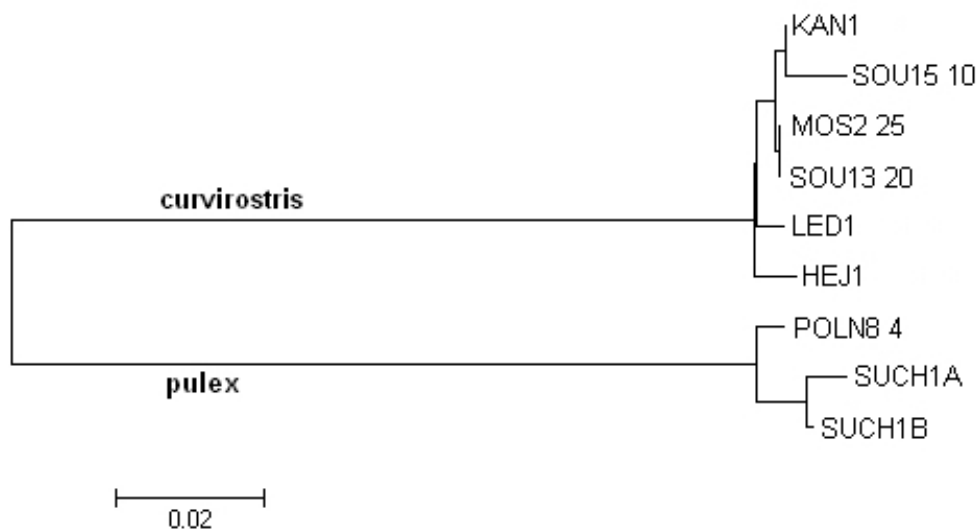
Vzorky určené pre sekvenáciu boli zaslané a sekvenované v laboratóriu MacroGen, inc. Sekvencie dodané z laboratória vo formáte *.ab1 boli v programe BioEdit 7.0 (Hall, 1999) manuálne skontrolované, zarovnané a uložené vo formáte Fasta. Následné analýzy boli vykonávané v programe Mega 3.1 (Kumar et al., 2004).

Výsledky a diskusia

Gén pre COI

Pri pokusoch o amplifikáciu génu pre COI bolo urobených celkom 174 izolácií a 384 PCR reakcií. Úspešnosť PCR reakcie s použitím univerzálneho COI primeru (Folmer et al., 1994) a štandardného protokolu Schwenk et al. (2000) bola menšia ako 20 %. Úpravou cyklu (znížením nasadacej teploty zo 40 na 35 °C) a zloženia reakčnej zmesi (zvýšenie koncentrácie MgCl₂ z 2,2 na 2,5 mM) bola zvýšená úspešnosť na približne 30 %. Úspešnosť PCR reakcie pri použití degenerovaných primerov a príslušného cyklu (Dirk Steinke, nepubl.) bola nulová. Pri takej nízkej úspešnosti PCR reakcie nemohol byť tento gén použitý na fylogeografické štúdie z dôvodu možnej selektívnej amplifikácie len určitých genotypov a teda nenáhodného výberu vzoriek. No napriek tomu bolo poslaných 9 vzoriek (6 *D. curvirostris* a 3 *D. pulex*) na sekvenáciu pre informáciu o nukleotidovej variabilite na tomto géne u skúmaných dvoch druhov dafnií. Všetky vzorky pre sekvenáciu boli dodané s primerom LCO-1490. Zo získaných 9 sekvencií s približnou dĺžkou 650 bp bol metódou Neighbor-Joining (NJ) vytvorený fylogram, znázornený na obr. 12. Na výslednom

fylograme (obr. 12) si môžeme všimnúť, že variabilita u sekvenovaných jedincov na COI je pomerne nízka, 2 až 6 variabilných miest na 650 bp dlhom úseku. To je rádovo menej v porovnaní s 59 variabilnými miestami zistenými na tomto géne u druhu *Eubbranchipus grubii* (Crustacea, Annostraca) Rychtrmocovou (2008). Je však možné, že sa nám pomocou použitého primeru podarilo selektívne amplifikovať len určité podobné genotypy a variabilnejšie genotypy, ktoré by mohli byť variabilné aj na miestach nasadania používaných primerov, sa nám amplifikovať nepodarilo. V skutočnosti tak môže byť variabilita na tomto géne vyššia, čo môže naznačovať aj zistenie, že všetky naše sekvenované jedince majú, až na výnimku MOS2 25 a SOU13 20, rôzne haplotypy. Variabilita na géne COI by sa preto dala použiť na testovanie nanáhodnej distribúcie a rozmiestnenia haplotypov medzi povodiami. K tomu by však bolo nevyhnutné osekvenovať z každej populácie niekoľko jedincov, čo sa nám v našich pokusoch nikdy nepodarilo.



Obr. 12. Fylogram z 9 sekvencií časti génu pre COI zobrazujúci vnútrodruhovú variabilitu, vytvorený metódou Neighbor-Joining. Mierka zodpovedá 2 % rozdielu v nukleotidovom zložení sekvencií. Kódy lokalít sú v tab. 7.

Bohužiaľ nami používaný univerzálny primer pre Metazoa (Folmer et al., 1994), ktorý je pri štúdiu kôrovcov (Crustacea) najpoužívanejší, poskytoval veľmi neuspokojivé výsledky. Nebolo tak možné porovnať výsledky s našou analýzou aložým, ani s inými prácami. U oboch druhov sa ním amplifikovalo len približne 30 % vzoriek. U amplifikovaných vzoriek však bola variabilita nízka, čo mohlo byť spôsobené buď selektívnou amplifikáciou len určitých haplotypov, alebo tiež kolonizáciou daných oblastí z relatívne málo diverzifikovaného zdroja. Vzhľadom na neskôr

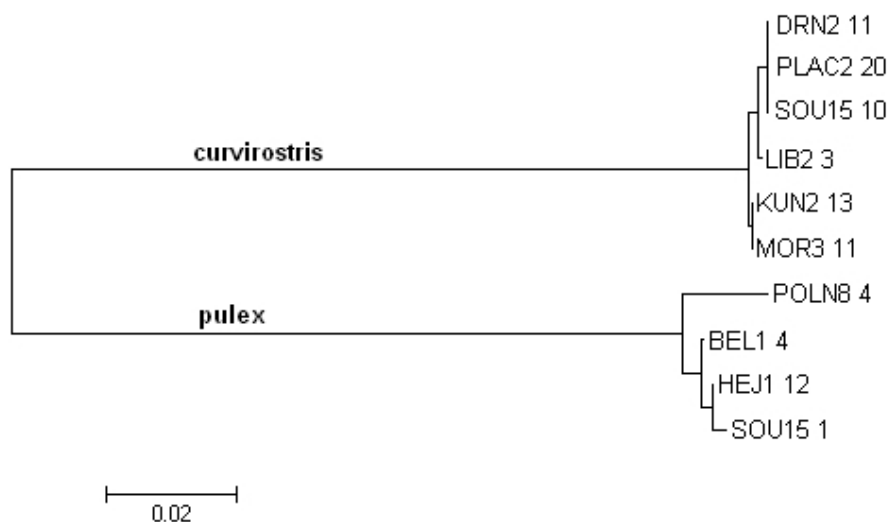
zistenú omnoho vyššiu variabilitu na géne ND2, ktorý nie je rádovo variabilnejší ako COI, je najpravdepodobnejšia varianta selektívnej amplifikácie len určitých haplotypov.

Riešením pre budúcnosť môže byť pokus o nájdenie konzervatívnejších oblastí na tomto géne, alebo využitie iného mitochondriálneho génu.

Gén pre 12S srRNA

Pre amplifikáciu časti génu pre malú ribozomálnu RNA (12S srRNA) bolo u 113 izolátov DNA urobených 138 PCR reakcií. Podarilo sa amplifikovať jedincov zo všetkých skúmaných populácií a celková úspešnosť PCR reakcie bola približne 82 %. Jedinci, ktorých sa nepodarilo amplifikovať na 12S srRNA, sa nikdy nepodarilo amplifikovať ani na COI a ND2, z čoho sme usúdili, že sa mohlo jednať o nepodarený izolát, takže celková úspešnosť PCR reakcie mohla byť v skutočnosti ešte väčšia. Neskôr sme pre vysokú účinnosť PCR reakcie používali tento gén ku kontrole kvality sporných izolátov.

Gén pre 12S srRNA je veľmi konzervatívny a hodí sa skôr na medzidruhové štúdie (Taylor et al., 1996; Schwenk et al., 1998; Krajíček, 2007; Petrusek et al., 2007), alebo pre fylogeografické štúdie vo veľkej geografickej mierke (Petrusek et al., 2008). Preto bolo pre sekvenáciu vybraných



Obr. 12. Fylogram z 10 sekvencií časti génu pre 12S zobrazujúci vnútrodruhovou variabilitu, vytvorený metódou Neighbor-Joining. Mierka zodpovedá 2 % rozdielu v nukleotidovom zložení sekvencií. Kódy lokalít sú v tab. 7.

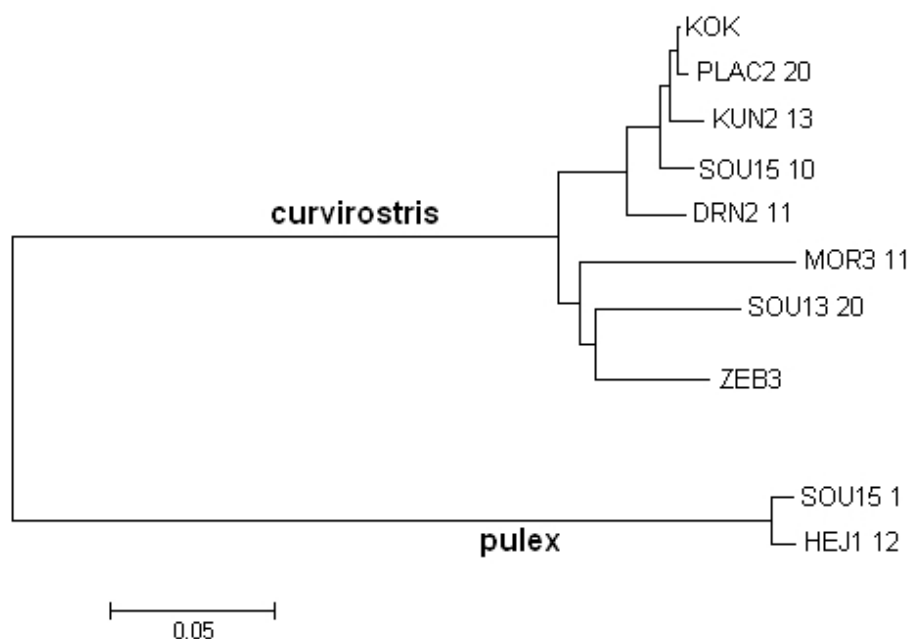
len 10 jedincov (6 *D. curvirostris* a 4 *D. pulex*) z rôznych lokalít, ktoré sa líšili na alozýmoch, aby sme získali informáciu o nukleotidovej variabilite na tomto géne u skúmaných dvoch druhov dafnií. Z dodaných 10 sekvencií s približnou dĺžkou 600 bp bol metódou NJ zostrojený fylogram

(obr. 12). Z obr. 12 je viditeľná veľmi nízka variabilita v rámci druhu. Skúmané sekvencie boli variabilné len na dvoch miestach, z toho jedno predstavovalo deléciu, a aj to len u jedného jedinca. Preto nie je možné tento gén použiť u skúmaných druhov na medzipopulačné porovnania vo zvolenej geografickej mierke.

Gén pre NADH-2 (ND2)

Pre amplifikáciu časti génu pre ND2 bolo u 194 izolátov DNA urobených 347 PCR reakcií. Nepodarilo sa však amplifikovať jedincov z niektorých skúmaných populácií. Celková úspešnosť PCR reakcie bola s použitím primerov MetF3 a TrpR, doporučených pre skúmané druhy dafnií (Ishida et al., 2006), len 27 %. Preto sme vyskúšali všetky možné kombinácie primerov MetF1, MetF2, MetF3, CysR a TrpR. Týmto sa zvýšilo množstvo amplifikovaných vzoriek na 42 %. S použitím vlastných primerov ND2CurF110, ND2CurF189 a ND2PulF186 sa nám podarilo amplifikovať aj vzorky, ktoré sa nám predtým amplifikovať nepodarilo. Stále ostávalo asi 20 % vzoriek, u ktorých sa nám nepodarilo amplifikovať gén pre ND2, ale kvalita izolátu bola potvrdená amplifikáciou génu 12S srRNA. Navyše nami vytvorené primery nasadali aj na iné úseky DNA, čo malo za následok množstvo rôzne dlhých fragmentov DNA, vytvorených pri PCR reakcii a znemožňujúcich sekvenáciu. Časť z nich sa podarilo odstrániť zvyšovaním nasadacej teploty zo 48 °C postupne až na 63 °C, no niektoré fragmenty sa stále amplifikovali aj pri vyšších teplotách. Pri ďalšom zvyšovaní teploty už PCR reakcia neprebiehala, pravdepodobne jeden z primerov už na DNA nenasadal. Zrejme sa jednalo o spätné (reverse) primery TrpR a CysR, ktoré boli konštruované na nižšie teploty. Nami navrhnuté spätné primery by nasadali na úseky veľmi blízko predných (forward) primerov a tak prípadné vzniknuté sekvencie by boli veľmi krátke, maximálne 240 bp, preto sme ich ani nevyrábali. V rámci možností vybavenia laboratória a pre zvyšujúcu sa finančnú náročnosť tohto projektu sa nám stále nepodarilo amplifikovať niektoré populácie, a preto sme od analýzy variability na vybraných úsekoch DNA bez získania významnejších výsledkov odstúpili.

Z obr. 13 je viditeľné, že variabilita na géne pre ND2 bola pomerne vysoká. Naše sekvenované vzorky sa skutočne líšili až na piatich percentách nukleotidov, čo predstavovalo približne 50 variabilných miest a čo už postačovalo na medzipopulačné porovnania. Podobný počet variabilných miest (59) využila pre testovanie rovnakej hypotézy, ale na géne pre COI, Rychtrmocová (2008).



Obr. 13. Fylogram z 10 sekvencií časti génu pre ND2 zobrazujúci vnútrodrohovú variabilitu, vytvorený metódou Neighbor-Joining. Mierka zodpovedá 5 % rozdielu v nukleotidovom zložení sekvencií. Kódy lokalít sú v tab. 7.

Zároveň nie je z obr. 13 badateľná žiadna geografická závislosť medzi sekvenovanými jedincami, ktorá by zoskupovala jedince podľa skupín (povodí), naznačujúc tak napr. kolonizáciu zo spoločného zdroja, a/alebo väčší genetický tok medzi populáciami v rámci povodia. Naopak populácie z rôznych povodí sú vzájomne premiešané, čo je v súlade s výsledkami z alozýmovej analýzy. Sekvenovaných vzoriek je však málo, aby mali nejakú vypovedaciu hodnotu. Je totiž možné, že sa amplifikovali len jedince, ktoré mali podobný haplotyp a to vytvára dojem, že tam žiadna geografická závislosť nie je. Naopak jedince s rôznymi haplotypmi sa nám nemuseli amplifikovať (napríklad vykazovali variabilitu aj na mieste nasadenia primerov, čo mohlo znemožňovať PCR reakciu) a preto môžu byť naše výsledky skreslené.

Pre budúci výskum navrhujeme vytvoriť viac špecifické primery nasadajúce len na konzervatívnejšie úseky tohto génu. Tým by sa mohla ešte zvýšiť úspešnosť PCR reakcie a odstrániť problémy s nasadením primerov aj na iné časti genómu.

Rovnakú hypotézu ako táto práca, ale na druhu *Eubbranchipus grubii* (Crustacea, Annostraca), testovala Rychtrmocová (2008). Analýzou variability na COI zistila odlišnosť medzi povodiami Morava-Labe, Dyje a Odry. Počet variabilných miest na COI u skúmaného druhu bol však vysoký: 59 zo 618 bp, podobný ako zistený počet v našej práci na géne ND2. Autorka pozorovala takmer

homogénne populácie v rámci povodí a vysokú odlišnosť medzi povodiami, čo je v súlade s našou hypotézou. Hlavne povodie Odry sa líši od ostatných veľmi markantne, čo autorka zdôvodňuje kolonizáciou z iného zdroja (refúgia). Rozdielnosť medzi povodiami celkovo pripisuje skôr historickému osídľovaniu krajiny z rôznych refúgií. No bez obmedzeného genetického toku cez hranice povodí by sa historický vplyv kolonizácie nemohol udržať. Bohužiaľ autorka neanalyzovala variabilitu na alozýmoch, kde by mohla ukázať rozdiel medzi variabilitou génov kódovaných v jadre a v mitochondriách. Zároveň by sa mohli porovnať výsledky tejto a jej práce, ktoré testujú rovnakú hypotézu, ale na inom modelovom organizme. Skúmané organizmy majú totiž niektoré rozdielne vlastnosti. Žiabronôžka *Eubbranchipus grubii* má oproti dafniám menšie populačné početnosti, dlhší ontogenetický vývoj a nemá partenogenetické rozmnožovanie. Majú však aj niektoré spoločné vlastnosti – vyskytujú sa spoločne v rovnakých biotopoch a podobne tvoria banky propagulí, uložené v sedimente, schopné diapauzy a disperzie. Vzájomným porovnaním oboch prác by sa preto dali lepšie kvantifikovať vplyvy napr. partenogenetickej reprodukcie na variabilitu medzi populáciami. Absencia partenogenetického množenia u žiabronôžok môže mať negatívny vplyv na kolonizáciu nových lokalít, lebo vyžaduje prítomnosť oboch pohlaví. Pri predpoklade poklesu počtu propagulí od zdroja klesá aj pravdepodobnosť osídlenia vzdialenejších lokalít oboma pohlaviami. To by mohlo vysvetľovať autorkou pozorované geograficky viac oddelené skupiny, ako aj takmer homogénne populácie v rámci povodí. Podobne prítomnosť haplotypov z iných povodí môže byť vysvetlená diaľkovým transportom trvalých vajíčok, napríklad pomocou vodných vtákov. Pretože pravdepodobnosť, že sa jedince z iných povodí dostanú na lokalitu, v ktorej už sú žiabronôžky oboch pohlaví, a predajú tam svoje gény, je omnoho vyššia ako pravdepodobnosť obsadenia novej lokality obidvoma pohlaviami.

Bohužiaľ sa nám z analýzy na vybraných úsekoch DNA nepodarilo získať dostatočné množstvo dát, ktoré by mohli doplniť, potvrdiť alebo vyvrátiť výsledky získané z alozýmovej analýzy. Vo zvolenej geografickej mierke sa ukázali byť vhodné mitochondriálne gény COI a ND2. Oba vykazujú dostatočne veľkú variabilitu potrebnú pre vnútro populačné fylogeografické štúdie, no u oboch nastali problémy s amplifikáciou časti vzoriek, čo znemožňovalo sledovať rozmiestnenie náhodne vybraných haplotypov medzi jednotlivými populáciami a povodiami. Gén pre 12 srRNA nevykazoval problémy pri amplifikácii, no zistená variabilita bola príliš nízka na fylogeografické štúdie vo zvolenej geografickej mierke.

Záver

Výsledky tejto práce s názvom „Vplyv disperzie a lokálnych procesov na genetickú diverzitu populácií *Daphnia curvirostris* a *Daphnia pulex* v kontexte regionálnej štruktúry riečnej siete” môžu byť zhrnuté nasledovne:

- vnútropopulačná genetická variabilita bola u oboch druhov vysoká a zodpovedá typu habitatov, z ktorých boli populácie prevažne odoberané – periodické vody. Hlavným zdrojom vysokej diverzity je sexuálna produkcia trvalých vajčiek, ich liahnutie v ďalšej sezóne a pomerne krátke obdobie klonálnej selekcie počas partenogenetickej reprodukcie, spôsobené krátkym trvaním vhodných podmienok v periodických vodách.
- Genetická variabilita druhu *Daphnia curvirostris* bola väčšia ako druhu *D. pulex*, čo môže byť spôsobené rozdielnymi ekologickými charakteristikami oboch druhov.
- Väčšina populácií sa nachádzala v Hardy-Weinbergovej rovnováhe, čo je charakteristické pre druhy s cyklickou partenogenezou z periodických vôd. U väčšiny populácií mimo H-W rovnováhu bol pozorovaný deficit heterozygotov, spôsobený pravdepodobne premiešaním banky propagulí (Wahlundovým efektom).
- Genetická variabilita medzi populáciami bola u oboch druhov vysoká, čo je často pozorovaný jav u skupiny Cladocera z periodických habitatov.
- Analýza molekulárneho rozptylu ukázala, že najväčšia časť variability je medzi lokálnymi populáciami, menšia je medzi populáciami v rámci povodí a najmenšia je medzi povodiami.
- Závislosť medzi geografickou a genetickou vzdialenosťou vyšla u oboch druhov nesignifikantná a to mohlo byť spôsobené vysokou variabilitou medzi blízkymi populáciami a tým zdanlivo nízkou medzi vzdialenými populáciami.
- Proces, zodpovedný najviac za medzipopulačnú genetickú variabilitu, je efekt priority sprostredkovaný bankou propagulí a pretrvávajúci po mnoho generácií, ktorý účinne pôsobí proti disperzii a znižuje tak efekt prebiehajúceho genetického toku.
- Výsledky z analýzy mitochondriálnych génov, ktoré by mohli doplniť, potvrdiť alebo vyvrátiť výsledky získané z alozýmovej analýzy, sa nám bohužiaľ nepodarilo získať v dostatočnom množstve, čo mohlo byť spôsobené variabilitou na mieste nasadenia primerov pre variabilné gény.

Literatúra

- Benzie, J.A.H., 2005.** The genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*) (Anomopoda: Daphniidae). Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. Vol. 21. Kenobi Productions, Ghent and Backhuys Publishers, Leiden.
- Berg, D.J., Garton, D.W., 1994.** Genetic differentiation in North American and European populations of the Cladoceran *Bythotrephes*. *Limnology and Oceanography*, 39: 1503-1516.
- Berg, L.M., 2005.** Fluctuating selection, egg banks and population genetic structure in cyclically parthenogenetic species. *Hydrobiologia*, 549: 287-295.
- Bilton, D.T., Freeland, J.R., Okamura, B., 2001.** Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 159-181.
- Bohonak, A.J., 1999.** Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology*, 74: 21-45.
- Bohonak, A.J., Jenkins, D.J., 2003.** Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecology Letters*, 6: 783-796.
- Boileau, M.G., Hebert, P.D.N., 1988.** Genetic differentiation of freshwater pond copepods at arctic sites. *Hydrobiologia*, 167: 393-400.
- Boileau, M.G., Hebert, P.D.N., Schwartz, S., 1992.** Non-equilibrium frequency divergence: persistent founder effect in natural populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 5: 1381-1387.
- Boileau, M.G., Taylor, B.E., 1994.** Chance events, habitat age, and the genetic structure of pond populations. *Archiv für Hydrobiologie*, 132:191-202.
- Brendonck, L., 1996.** Diapause, quiescence, hatching requirements: What we can learn from large freshwater branchiopods (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca, Notostraca, Conchostraca). *Hydrobiologia*, 320: 85-97.
- Brendonck, L., De Meester, L., Riddoch, B.J., 2000.** Regional structuring of genetic variation in short-lived rock pool populations of *Branchipodopsis wolffi* (Crustacea: Anostraca). *Oecologia*, 123: 506-515.
- Brendonck, L., Riddoch, B.J., 1999.** Wind-borne short-range egg dispersal in anostracans (Crustacea: Branchiopoda). *Biological Journal of Linnean Society*, 67: 87-95.
- Brendonck, L., Riddoch, B.J., 2000.** Egg bank dynamics in anostracan desert rock pool populations (Crustacea : Branchiopoda). *Archiv für Hydrobiologie*, 148: 71-84.
- Cáceres, C.E., Soluk, D.A., 2002.** Blowing in the wind: a field test of overland dispersal and colonization by aquatic invertebrates. *Oecologia*, 131: 402-408.
- Černý, M., 1995.** Genetic variation in temperate populations of *Daphnia pulex* group. PhD thesis.
- Černý, M., Hebert, P.D.N., 1993.** Genetic diversity and breeding system variation in *Daphnia pulicaria* from North American lakes. *Heredity*, 71: 497-507.
- Černý, M., Hebert, P.D.N., 1999.** Intercontinental genetic differentiation among four holarctic *Daphnia* species. *Limnology and Oceanography*, 44: 1381-1387.

- Charalambidou, I., Santamaría, L., 2002.** Waterbirds as endozoochorous dispersers of aquatic organisms: a review of experimental evidence. *Acta Oecologica*, 23: 165-176.
- Colbourne, J.K., Hebert, P.D.N., 1996.** The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 351: 349-360.
- Cottenie, K., Michels, E., Nuytten, N., De Meester, L., 2003.** Zooplankton metacommunity structure: regional versus local processes in highly interconnected ponds. *Ecology*, 84: 991-1000.
- Cox, A.J., Hebert, P.D.N., 2001.** Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10: 371-386.
- Crease, T.J., Lee, S.K., Yu, S.L., Spitze, K., 1997.** Allozyme and mtDNA variation in populations of the *Daphnia pulex* complex from both side of the Rocky Mountains. *Heredity*, 79: 242-251.
- Crease, T.J., Lynch, M., Spitze, K., 1990.** Hierarchical analysis of population genetic variation in mitochondrial and nuclear genes of *Daphnia pulex*. *Molecular Ecology and Evolution*, 7: 444-458.
- Davies, C.P., Simovich, M.A., Hathaway, S.A., 1997.** Population genetic structure of a California endemic branchiopod, *Branchinecta sandiegonensis*. *Hydrobiologia*, 359:149-158.
- De Meester, L., 1993.** Inbreeding and outbreeding depression in *Daphnia*. *Oecologia*, 96: 80-84.
- De Meester, L., 1996.** Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: Patterns and processes. *Ecoscience*, 3: 385-399.
- De Meester, L., Gomez, A., Okamura, B., Schwenk, K., 2002.** The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23: 121-135.
- De Melo, R., Hebert, P.D.N., 1994.** Founder effects and geographical variation in the invading cladoceran *Bosmina* (*Eubosmina*) *coregoni* Baird 1857 in North America. *Heredity*, 73: 490-499.
- Declerck, S., Cousyn, CH., De Meester, L., 2001.** Evidence for local adaptation in neighbouring *Daphnia* populations: a laboratory transplant experiment. *Freshwater Biology*, 46: 187-198.
- Dieckmann, U., O'Hara, B., 1999.** The evolutionary ecology of dispersal. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 88-90.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Figuerola, J., Green, A. J., 2002.** Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology*, 47: 483-494.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Frisch, D., 2002.** Dormancy, dispersal and the survival of cyclopoid copepods (Cyclopoida, Copepoda) in a lowland floodplain. *Freshwater Biology*, 47: 1269-1281.

- Glaubitz, J.C., 2004.** CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4: 309-310.
- Green, A.J., Figuerola, J., 2005.** Recent advances in the study of long-distance dispersal of aquatic invertebrates via birds. *Diversity and Distributions*, 11: 149-156.
- Haag, C.R., Hottinger, J.W., Riek, M., Ebert, D., 2002.** Strong inbreeding depression in a *Daphnia* metapopulation. *Evolution*, 56: 518-526.
- Hairston, N.G., 1996.** Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography*, 41: 1087-1092.
- Hairston, N.G., DeStasio, B.T., 1988.** Rate of evolution slowed by a dormant propagule pool. *Nature*, 336: 239-242.
- Hairston, N.G., Vanbrunt, R.A., Kearns, C.M., Engstrom, D.R., 1995.** Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology*, 76: 1706-1711.
- Hall, A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hann, B.J., Hebert, P.D.N., 1986.** Genetic variation and population differentiation in species of *Simocephalus* (Cladocera, Daphniidae). *Canadian Journal of Zoology*, 64: 2246-2256.
- Havel, J.E., Eisenbacher, E.M., Black, A.M., 2000.** Diversity of crustacean zooplankton in riparian wetlands: colonization and egg banks. *Aquatic Ecology*, 34: 63-76.
- Havel, J.E., Mabee, M.R., Jones, J.R., 1995.** Invasion of the exotic cladoceran *Daphnia lumholtzi* into North American reservoirs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 151-160.
- Havel, J.E., Shurin, J. B., 2004.** Mechanisms, effects, and scales of dispersal in freshwater zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 49: 1229-1238.
- Hebert, P.D.N., 1974.** Enzyme variability in natural populations of *Daphnia magna*. I. Population structure in East Anglia. *Evolution*, 28: 546-556.
- Hebert, P.D.N., 1987.** Genotypic characteristics of the Cladocera. *Hydrobiologia*, 145: 183-193.
- Hebert, P.D.N., 1995.** The *Daphnia* of North America: An illustrated fauna. CD-ROM, University of Guelph, Guelph.
- Hebert, P.D.N., Beaton, M.J., 1989.** Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Helena Laboratories, Beaumont, Texas.
- Hebert, P.D.N., Finston, T.L., 1996.** Genetic differentiation in *Daphnia obtusa*: a continental perspective. *Freshwater Biology*, 35: 311-321.
- Hebert, P.D.N., Schwartz, S.S., Hrbáček, J., 1989a.** Patterns of genotypic diversity in Czechoslovakian *Daphnia*. *Heredity*, 62: 207-216.
- Hebert, P.D.N., Schwartz, S.S., Ward, R.D., Finston, T.L., 1993.** Macrogeographic pattern of breeding system diversity in the *Daphnia pulex* group. I Breeding system of Canadian populations. *Heredity*, 70: 148-161.
- Hebert, P.D.N., Schwartz, S.S., Weider, L.J., 1989b.** Geographical patterns in genetic diversity and partenogenesis within the *Daphnia pulex* group from the southern United States. *American Midland Naturalist*, 122: 59-56.

- Hebert, P.D.N., Ward, R.D., Weider, L.J., 1988.** Clonal diversity patterns and breeding-system variation in *Daphnia pulex*, an asexual-sexual complex. *Evolution*, 42: 147-159.
- Hrbáček, J., 1959.** Über die angebliche Variabilität von *Daphnia pulex* L. *Zoologischer Anzeiger*, 162: 116-126.
- Hrbáček, J., 1987.** Systematics and biogeography of *Daphnia* species in the northern temperate region. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 45: 37-76.
- Hughes, M.J., 2007.** Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshwater Biology*, 52: 616-631.
- Innes, D.J., 1991.** Geographic patterns of genetic differentiation among sexual populations of *Daphnia pulex*. *Canadian Journal of Zoology*, 69: 995-1003.
- Innes, D.J., Schwartz, S.S., Hebert, P.D.N., 1986.** Genotypic diversity and variation in mode of reproduction among populations in the *Daphnia pulex* group. *Heredity*, 57: 345-355.
- Ishida, S., Kotov, A.A., Taylor, D.J., 2006.** A new divergent lineage of *Daphnia* (Cladocera: Anomopoda) and its morphological and genetical differentiation from *Daphnia curvirostris* Eylmann, 1887. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146: 385-405.
- Jenkins, D.G., 1995.** Dispersal-limited zooplankton distribution and community composition in new ponds. *Hydrobiologia*, 313: 15-20.
- Jenkins, D.G., Buikema, A.L., 1998.** Do similar communities develop in similar sites? *Ecological Monographs*, 68: 421-443.
- Korpelainen, H., 1984.** Genetic differentiation of *Daphnia magna* populations. *Hereditas*, 101: 209-216.
- Krajíček, M., 2007.** Genetická variabilita středoevropských buchanek r. *Cyclops*. Diplomová práce.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004.** MEGA3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.
- Larsson, P., Weider, L.J., 1995.** Cladocera as model organisms in biology. *Hydrobiologia*, 307: 1-3.
- Louette, G., Vanoverbeke, J., Ortells, R., De Meester, L., 2007.** The founding mothers: the genetic structure of newly established *Daphnia* populations. *Oikos*, 116: 728-741.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P., 2004.** *Ecological genetics: Design, Analyses, and Application*. Blackwell Publishing, Malden, USA.
- Lynch, M., 1987.** The consequences of fluctuating selection for isozyme polymorphisms in *Daphnia*. *Genetics*, 115: 657-669.
- Lynch, M., Spitze, K., 1994.** Evolutionary genetics of *Daphnia*. *Ecological Genetics*, 109-128. Princeton University Press. Princeton.
- Meffe, G.K., Vrijenhoek, R.C., 1988.** Conservation genetics of desert fishes. *Conservation Biology*, 2: 157-167.
- Michels, E., Audenaert, A., Ortells, R., De Meester, L., 2003.** Population genetic structure of three-inhabiting *Daphnia* species on a regional scale (Flanders, Belgium). *Freshwater Biology*, 48: 1825-1839.

- Michels, E., Cottenie, K., Neys, L., De Gelas, K., Coppin, P., De Meester, L., 2001a.** Geographical and genetic distances among zooplankton populations in a set of interconnected ponds: a plea for using GIS modelling of the effective geographical distance. *Molecular Ecology*, 10: 1929-1938.
- Michels, E., Cottenie, K., Neys, L., De Meester, L., 2001b.** Zooplankton on the move: first results on the quantification of dispersal of zooplankton in a set of interconnected ponds. *Hydrobiologia*, 442: 117-126.
- Mort, M.A., 1991.** Bridging the gap between ecology and genetics: the case of freshwater zooplankton. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 41-45.
- Mort, M.A., Wolf, H.G., 1986.** The Genetic Structure of Large-Lake *Daphnia* Populations. *Evolution*, 40: 756-766.
- Nei, M., 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei, M., 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Nevo, E., Beileo, A., Ben-Shlomo, R., 1983.** The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates. In: Mani, G.S., (ed.) *Evolutionary dynamics of genetic diversity. Lecture Notes in Biomathematics*, 53: 13-213.
- Okamura, B., Freeland, J., 2002.** Gene flow and the evolutionary ecology of passively dispersing aquatic invertebrates. *Dispersal*. Blackwell Scientific Publications, London.
- Pálsson, S., 2000.** Microsatellite variation in *Daphnia pulex* from both sides of the Baltic sea. *Molecular Ecology*, 9: 1075-1088.
- Pálsson, S., 2001.** The effect of deleterious mutations in cyclically partenogenetic organisms. *Journal of Theoretical Biology*, 208: 201-204.
- Petrusek, A., 2000.** Genetic structure and taxonomy of Central European populations of *Moina* (Crustacea: Anomopoda). MSc. Thesis.
- Petrusek, A., Černý, M., Mergeay, J., Schwenk, K., 2007.** *Daphnia* in the Tatra Mountain lakes: multiple colonisation and hidden species diversity revealed by molecular markers. *Fundamental and Applied Limnology*, 169: 279-291.
- Petrusek, A., Hobæk, A., Nilssen, J.P., Skage, M., Černý, M., Brede, N., Schwenk, K., 2008.** A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). *Zoologica Scripta*, 37: 507-519.
- Philippi, T.E., Simovich, M.A., Bauder, E.T., Moorad, J.A., 2001.** Habitat ephemerality and hatching fractions of a diapausing anostracan (Crustacea : Branchiopoda). *Israel Journal of Zoology*, 47: 387-395.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Rice, W.R., 1989.** Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Rousset, T., 1997.** Genetic differentiation and estimation from gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219-1228.

- Rowe, C.L., Adamowicz, S.J., Hebert, P.D.N., 2007.** Three new cryptic species of the freshwater zooplankton genus *Holopedium* (Crustacea : Branchiopoda : Ctenopoda), revealed by genetic methods. *Zootaxa*, 1656: 1-49.
- Rychtrmárová, H., 2008.** Vliv možnosti šíření žábronožek (Crustacea: Anostraca) na genetickou strukturu populací. Diplomová práce.
- Santamaría, L., Klaassen, M., 2002.** Waterbird-mediated dispersal of aquatic organisms: an introduction. *Acta Oecologica*, 23: 115-119.
- Schwenk, K., Posada, D., Hebert, P.D.N., 2000.** Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. – Proceedings of the Royal Society of London, Series B, 267: 1833-1842.
- Schwenk, K., Sand, A., Boersma, M., Brehm, M., Mader, E., Offerhaus, D., Spaak, P., 1998.** Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the Cladocera. *Aquatic Ecology*, 32: 37-51.
- Simovich, M.A., Hathaway, S.A., 1997.** Diversified bet-hedging as a reproductive strategy of some ephemeral pool anostracans (Branchiopoda). *Journal of Crustacean Biology*, 17: 38-44.
- Slatkin, M., 1985.** Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 393-430.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995.** Biometry. Third edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, 267: 1833-1842.**
- Spitze, K., 1993.** Population genetic structure of *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozyme variation. *Genetics*, 135: 367-374.
- StatSoft, Inc., 1998.** STATISTICA for Windows. Computer program. StatSoft, Inc., Tulsa.
- Taylor, D.J., Hebert, P.D.N., Colbourne, J.K., 1996.** Phylogenetics and evolution of the *Daphnia longispina* group (Crustacea) based on 12S rDNA sequence and allozyme variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 495-510.
- Vanoverbeke, J., De Meester, L., 1997.** Among-population genetic differentiation in the cyclical parthenogen *Daphnia magna* (Crustacea, Anomopoda) and its relation to geographic distance and clonal diversity. *Hydrobiologia*, 360: 135-142.
- Ward, R.D., Bickerton, M.A., Finston, T., Hebert, P.D.N., 1994.** Geographical cline in breeding systems and ploidy levels in European populations of *Daphnia pulex*. *Heredity*, 73: 532-543.
- Ward, R.D., Geissler, P.A., 1988.** Reproductive mode in populations of *Daphnia pulex* and *Daphnia obtusa* from the East Midlands of Britain. *Freshwater Biology*, 20: 69-73.
- Weider, L.J., 1989.** Population genetics of *Polyphemus pediculus* (Cladocera: Polyphemidae). *Heredity*, 62: 1-10.
- Weider, L.J., Hobæk, A., Crease, T.J., Stibor, H., 1996.** Molecular characterization of clonal population structure and biogeography of arctic apomictic *Daphnia* from Greenland and Iceland. *Molecular Ecology*, 5: 107-118.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

- Wright, S., 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Yang, R.C., Ye, Z., Mao, J., 1997.** POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alta.

Prílohy

Zoznam tabuliek:

Tab. I-1 a I-2. Základné vnútro populačné charakteristiky pre všetky populácie *D. pulex* a *D. curvirostris*

Tab. I-3 a I-4. Alelické frekvencie pre všetky lokusy vo všetkých populáciách *D. curvirostris* a *D. pulex*

Obsah priloženého CD

Priložený kompaktný disk obsahuje okrem textu tejto práce aj vstupné data z alozýmovej analýzy. Data pre oba skúmané druhy sú uložené ako text vo formáte txt. Súčasťou CD je aj voľne šíriteľný program CONVERT (Glaubitz, 2004), pomocou ktorého sa dajú tieto vstupné data transformovať do podoby vhodnej pre analýzu v niektorých populačne genetických programoch.

Zoznam súborov na priloženom CD:

1. Vstupné dáta *Daphnia curvirostris*.txt
2. Vstupné dáta *Daphnia pulex*.txt
3. CONVERT.exe

Tab. I – 1. Základné vnútropopulačné charakteristiky pre všetky analyzované populácie druhu *D. pulex*. Lokality zoradené abecedne. Legenda: n – počet analyzovaných jedincov, P – počet polymorfných lokusov a ich percentuálne zastúpenie - %, H_o – pozorovaná heterozygotnosť a jej smerodajná odchýlka – SD, H_E – očakávaná heterozygotnosť a jej smerodajná odchýlka – SD, p – pravdepodobnosť exaktného testu, že populácia sa nachádza v H-W rovnováhe, MLG_o – pozorovaný počet genotypov, MLG_E – očakávaný počet genotypov, GDR – index genotypovej diverzity, α – pravdepodobnosť, že populácia sa nachádza v H-W rovnováhe odvodená z GDR. R.S. – rozmnožovací systém (podrobnejšie viď metodika). Tučným sú zvýraznené výsledky, ktoré sa signifikantne líšia od H-W rovnováhy. Skratky: NA – žiadny výpočet, HS – vysoko signifikantný výsledok, C – cyklická partenogenéza, O – obligátna partenogenéza, U – neistý reprodukčný systém

Lokalita	kód	n	P	%	H_o	SD	H_E	SD	p	MLG_o	MLG_E	GDR	α	R.S.
Běleč 1	BEL1	41	3	50	0,03	0,06	0,06	0,08	0,1668	6	6,16	0,97	0,49	C
Bulhary	JM05	2	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	1	1,00	1,00	0,47	C
Horka 1	HOR1	44	4	67	0,03	0,04	0,07	0,10	HS	8	8,34	0,96	0,49	U
Jazerské Jazero	VS04	44	1	20	0,02	0,05	0,04	0,07	0,2297	2	2,28	0,88	0,46	C
Jazerské Jazero	VS05	44	3	50	0,03	0,05	0,11	0,20	1,0000	5	6,50	0,77	0,41	C
Kančí obora 2	BEL1	42	5	83	0,17	0,16	0,24	0,18	0,0093	24	25,42	0,94	0,47	C
Kapušany 1	VS13	54	3	50	0,13	0,19	0,20	0,25	0,8535	14	20,16	0,69	0,37	C
Kapušany 3	VS14	36	4	67	0,09	0,12	0,13	0,15	0,0268	15	12,03	1,25	0,40	C
Kapušany 6	VS19	12	4	67	0,17	0,16	0,26	0,25	0,2932	9	10,27	0,88	0,38	C
Les Království 3	KRAL3	11	2	33	0,08	0,19	0,16	0,25	0,3942	6	6,45	0,93	0,46	C
Lužnice Rameno	JC08	44	5	83	0,12	0,15	0,13	0,16	0,5057	7	9,61	0,73	0,40	C
Lužnice Kulatá	JC01	44	3	50	0,09	0,12	0,10	0,16	0,4672	6	8,30	0,72	0,42	C
Ondava 1	VS07	44	4	67	0,07	0,08	0,12	0,18	1,0000	10	9,62	1,04	0,49	C
Perín - Chym	VS58	2	2	50	0,38	0,48	0,46	0,53	0,3286	2	1,92	1,04	0,44	C
Podlouhlá	JC06	12	2	33	0,12	0,18	0,13	0,20	0,5193	5	7,75	0,65	0,38	C
Podlouhlá	JC07	42	3	50	0,07	0,11	0,08	0,14	0,7717	3	3,61	0,83	0,42	C
Polanská niva 8	POLN8	39	4	67	0,09	0,14	0,15	0,18	0,0006	9	15,44	0,58	0,34	U
Přerov 1	SC51	40	1	17	0,10	0,23	0,09	0,22	0,4663	3	4,34	0,69	0,37	C
Přerov 2	SC52	40	1	17	0,06	0,15	0,08	0,19	0,3032	2	2,98	0,67	0,14	C
Přerov 3	SC53	7	3	50	0,21	0,25	0,20	0,23	0,7360	6	5,45	1,10	0,42	C
Římov - priehrada	JC09	12	3	50	0,11	0,14	0,16	0,18	0,1105	6	6,47	0,93	0,46	C
Somotor - Věč	VS10	18	3	50	0,03	0,03	0,06	0,10	0,0022	5	4,67	1,07	0,47	C
Soutok 15	SOU15	39	5	83	0,16	0,17	0,21	0,20	0,2809	18	23,20	0,78	0,37	C
Střeň 2	STR2	41	5	83	0,11	0,07	0,21	0,13	0,0001	19	23,67	0,80	0,39	U
Suchdol 1	SUCH1	18	2	33	0,06	0,11	0,07	0,12	0,7789	5	4,88	1,02	0,49	C
Suchdol 2	SUCH2	40	3	50	0,06	0,09	0,07	0,09	0,9102	8	6,81	1,17	0,45	C
Tiché	TA51	40	1	20	0,01	0,01	0,01	0,01	NA	2	1,68	1,19	0,46	C
Tiché	TA52	44	3	50	0,04	0,04	0,04	0,05	0,7305	5	5,31	0,94	0,48	C
Tůň u Smyslova	BL61	44	1	17	0,12	0,24	0,09	0,17	0,3883	3	2,41	1,24	0,43	C
Tůň u Starého	BL51	18	2	33	0,03	0,06	0,03	0,08	0,3625	2	4,14	0,48	0,29	C
Týniště 2	TYN2	36	6	100	0,13	0,17	0,28	0,14	HS	19	25,35	0,75	0,34	U
U domu	JC05	42	3	50	0,16	0,15	0,11	0,15	0,6602	5	6,80	0,74	0,41	C
U dubu východ	JC04	44	4	67	0,13	0,14	0,16	0,17	0,2303	7	11,59	0,60	0,34	C
U dubu západ	JC02	44	4	67	0,13	0,17	0,13	0,17	0,8427	6	11,94	0,50	0,31	C
U dubu západ	JC03	44	3	50	0,17	0,25	0,16	0,20	0,2330	7	9,64	0,73	0,40	C
Velké Tomanové	TA53	44	2	33	0,01	0,01	0,01	0,01	NA	3	2,29	1,31	0,43	C
Velké Tomanové	TA54	44	2	33	0,04	0,07	0,04	0,06	1,0000	5	4,59	1,09	0,48	C
Zemplín	VS21	10	2	33	0,13	0,28	0,10	0,19	HS	3	3,47	0,86	0,44	U
Žebračka 3	ZEB3	6	2	33	0,14	0,22	0,16	0,25	0,8538	5	4,11	1,22	0,35	C

Tab. I – 2. Základné vnútro populačné charakteristiky pre všetky analyzované populácie druhu *D. curvirostris*. Legenda vid' tab. I – 1 hore.

Lokalita	kód	n	P	%	H ₀	SD	H _E	SD	p	MLG ₀	MLG _E	GDR	α	R.S.
Bruksa 1	BRUK1	44	5	83	0,21	0,12	0,39	0,20	HS	35	39,59	0,88	0,36	U
Bulhary	JM03	39	6	100	0,24	0,23	0,29	0,25	0,105	33	33,53	0,98	0,48	C
Čeperka 1	CEP1	44	1	17	0,09	0,23	0,08	0,20	0,5284	2	3	0,67	0,00	U
Drnholec 2	DRN2	44	5	83	0,23	0,19	0,24	0,21	0,4093	21	25,76	0,82	0,40	C
Filena 1	FIL1	44	5	83	0,24	0,30	0,24	0,29	0,932	21	29,11	0,72	0,34	C
Hejtmanka 1	HEJ1	44	4	67	0,12	0,16	0,18	0,18	0,1331	12	19,07	0,63	0,34	C
Hrhov	VS01	43	1	17	0,03	0,08	0,03	0,07	1	2	2,32	0,86	0,46	C
Ináčovce	VS03	43	2	33	0,15	0,23	0,18	0,29	0,057	13	18,65	0,70	0,36	C
Kapušany 3	VS16	2	2	33	0,25	0,42	0,25	0,42	NA	2	1,82	1,10	0,41	C
Kapušany 4	VS17	44	3	50	0,12	0,18	0,18	0,28	0,001	10	17,06	0,59	0,32	C
Kapušany 6	VS18	30	4	67	0,21	0,24	0,27	0,28	HS	19	22,54	0,84	0,38	U
Královstvi 1	KRAL1	39	5	83	0,38	0,27	0,38	0,21	0,0246	33	30,9	1,07	0,43	C
Kralovstvi 3	KRAL3	32	4	67	0,19	0,18	0,34	0,27	0,0006	25	27,66	0,90	0,40	U
Kunovický les 2	KUN2	44	4	67	0,20	0,24	0,25	0,27	0,2162	18	26,71	0,67	0,30	C
Lednice 2	LED2	38	4	67	0,11	0,11	0,19	0,23	HS	13	18,94	0,69	0,37	U
Libice 2	LIB2	44	4	67	0,17	0,22	0,26	0,27	HS	17	19,87	0,86	0,43	U
Moravičany 3	MOR3	39	4	67	0,27	0,29	0,28	0,28	0,6626	21	27,36	0,77	0,33	C
Mošovský luh 2	MOS2	44	4	67	0,18	0,20	0,22	0,25	0,0905	26	28,16	0,92	0,46	C
Nejdek 2	NEJ2	44	4	67	0,14	0,22	0,18	0,23	0,9128	15	21,22	0,71	0,35	C
Nesyt 1	NES1	40	4	67	0,12	0,20	0,20	0,22	0,0079	9	15,38	0,59	0,33	C
Očov 3	OCOV3	40	5	83	0,19	0,20	0,19	0,17	0,7117	15	18,96	0,79	0,42	C
Perín - Chym	VS08	6	1	17	0,17	0,41	0,09	0,22	0,0895	2	2,49	0,80	0,37	C
Plačkov les 2	PLAC2	44	5	83	0,14	0,12	0,20	0,19	0,4262	20	22,29	0,90	0,46	C
Podivín	JM04	43	2	33	0,15	0,35	0,13	0,30	0,0018	5	10,28	0,49	0,23	C
Pohránov 1	POH1	40	5	83	0,13	0,14	0,20	0,17	0,0001	24	21,49	1,12	0,45	U
Polanská niva 8	POLN8	7	5	83	0,14	0,16	0,33	0,25	0,0108	8	6,64	1,20	0,21	C
Přerov n. Labem	PRER	20	2	33	0,08	0,13	0,10	0,18	0,6025	5	5,37	0,93	0,47	C
Přerov 1	SC11	43	3	50	0,20	0,22	0,24	0,27	0,0352	16	23,86	0,67	0,32	C
Přerov 2	SC12	21	5	83	0,17	0,15	0,22	0,20	0,346	12	13,17	0,91	0,45	C
Přerov 3	SC13	39	4	67	0,20	0,21	0,22	0,23	0,1848	16	20,46	0,78	0,39	C
Přerov 4	SC14	44	4	67	0,28	0,23	0,31	0,25	0,4826	24	32,5	0,74	0,29	C
Smiřice 1	SMIR1	44	2	33	0,14	0,25	0,16	0,28	0,1849	10	29,01	0,34	0,15	C
Somotor - Věč	VS09	25	3	50	0,12	0,26	0,11	0,24	0,6146	5	6,63	0,75	0,40	C
Soutok 12	SOU12	44	5	83	0,09	0,15	0,38	0,25	HS	21	40,83	0,51	0,05	O
Soutok 13	SOU13	40	5	83	0,20	0,18	0,29	0,26	0,0182	28	31,36	0,89	0,41	C
Soutok 15	SOU15	5	5	83	0,20	0,18	0,29	0,21	0,5917	6	4,77	1,26	0,16	C
Soutok 9	SOU9	40	5	83	0,13	0,17	0,43	0,23	HS	37	37,37	0,99	0,49	U
Streda n. Bodrogom	VS11	12	4	67	0,17	0,21	0,25	0,21	0,3938	8	9,29	0,86	0,39	C
Střeň 2	STR2	19	4	67	0,15	0,18	0,24	0,25	0,1416	14	13,61	1,03	0,48	C
Tůň u Starého	BL62	44	3	50	0,21	0,24	0,25	0,28	0,5146	15	24,7	0,61	0,28	C
Týniště 2	TYN2	18	5	83	0,19	0,17	0,39	0,22	HS	19	17,37	1,09	0,31	U
Valy	VC01	44	3	50	0,14	0,24	0,13	0,22	0,0739	7	12,92	0,54	0,32	C
Včelín 2	VC02	45	4	67	0,19	0,23	0,28	0,29	0,0112	22	32,59	0,68	0,29	C
Zebračka 3	ZEB3	38	4	67	0,29	0,31	0,30	0,31	0,045	22	30,43	0,72	0,29	C
Zemplín	VS20	12	2	33	0,14	0,22	0,17	0,27	0,277	4	6,85	0,58	0,25	C

Tab. I-3. Alelické frekvencie a fixačné indexy F_{IS} (Wright, 1965) na skúmaných lokusoch vo všetkých populáciách *D. curvirostris*

Povodie		Dyje									Morava									Sútok				
Lokus	Alela	DRN2	MOS2	PLAC2	NES1	JM03	NEJ2	LED2	JM04	BRUK1	MOR3	HEJ1	STR2	KRAL1	KRAL3	ZEB3	VCEL2	FIL1	KUN2	OCOV3	SOU9	SOU12	SOU13	SOU15
	N	44	44	44	40	39	44	38	43	44	39	44	19	39	32	38	45	44	44	40	40	44	40	5
PGM	A	0,114	0,148	0,091		0,231	0,068	0,092	0,209													0,011		
	B	0,102	0,046	0,159	0,463	0,218	0,159	0,184	0,326	0,203	0,397	0,023	0,421		0,281	0,342	0,056	0,227	0,477	0,026	0,065	0,034	0,225	0,200
	C					0,449	0,114		0,314	0,095	0,039	0,802			0,125		0,256	0,148					0,100	0,200
	D	0,705	0,727	0,750	0,525	0,103	0,625	0,605	0,151	0,703	0,500	0,128	0,500	0,540	0,563	0,553	0,567	0,375	0,477	0,684	0,371	0,273	0,488	0,600
	E	0,080	0,080		0,013		0,034	0,118			0,064	0,047		0,461	0,031	0,105	0,111	0,239	0,046	0,276	0,484	0,341	0,188	
	F												0,079				0,011	0,011		0,013	0,081	0,341		
	F _{IS}	0,041	0,124	0,156	0,020	0,030	-0,045	0,499	-0,181	0,230	0,082	-0,035	0,257	-0,430	0,309	-0,022	0,331	0,033	0,036	-0,158	0,307	0,442	0,250	0,286
PGI	A	0,034	0,068	0,011		0,013	0,046	0,040											0,023		0,063		0,038	
	B	0,011	0,068			0,026			0,012									0,034						
	C	0,955	0,625	0,943	1,000	0,897	0,955	0,934	0,988	0,568	0,397	0,802	0,684		0,578	0,421	0,667	0,682	0,671	0,829	0,500	0,216	0,850	0,800
	D		0,182	0,034		0,051		0,013		0,378	0,577	0,198	0,079	0,167	0,391	0,461	0,167	0,261	0,171	0,132	0,013	0,091	0,100	0,100
	E		0,057	0,011		0,013		0,013		0,054	0,026		0,237	0,833	0,031	0,118	0,167	0,023	0,136	0,040	0,425	0,693	0,013	0,100
	F _{IS}	-0,038	0,194	-0,043		0,060	-0,048	-0,050	-0,012	0,644	-0,109	0,047	0,327	0,478	0,451	0,074	-0,111	-0,173	0,095	-0,164	0,779	0,804	0,248	-0,177
MPI	A																							
	B	0,046		0,023	0,025					0,041	0,244				0,063	0,276		0,034		0,013		0,057	0,013	
	C					0,051				0,243		0,023		0,030	0,156	0,026					0,349	0,057		0,100
	D	0,955	1,000	0,943	0,975	0,949	1,000	0,974	1,000	0,716	0,680	0,977	1,000	0,682	0,734	0,592	1,000	0,966	1,000	0,987	0,621	0,591	0,975	0,900
	E													0,288		0,105					0,030	0,296		
	F			0,034				0,026			0,077			0,047									0,013	
	F _{IS}	-0,048		-0,045	1,000	0,473		-0,027		0,493	-0,084	1,000		-0,044	0,201	-0,078		-0,035		-0,013	0,938	0,951	-0,019	-0,111
AO	A			0,011																				
	B	0,011	0,046	0,057		0,203	0,023			0,135		0,058	0,139				0,044		0,023	0,026		0,057	0,038	
	C	0,398	0,114	0,250	0,175	0,672	0,193	0,184		0,243	0,039	0,174		0,290	0,469	0,040	0,333	0,034	0,284	0,079	0,236	0,034	0,325	0,200
	D	0,591	0,841	0,682	0,825	0,125	0,784	0,790	1,000	0,622	0,962	0,767	0,861	0,711	0,531	0,961	0,622	0,966	0,693	0,895	0,764	0,909	0,638	0,800
	E							0,026																
	F _{IS}	0,169	0,182	0,564	1,000	0,364	0,804	0,539		0,647	0,653	0,753	0,768	0,156	0,749	0,653	0,733	0,655	0,481	0,180	0,923	0,731	0,538	1,000
AAT	A	0,171				0,039	0,023			0,054							0,033	0,023				0,023	0,063	
	B	0,830	0,989	0,955	0,775	0,962	0,955	1,000	1,000	0,797	1,000	1,000	0,947	0,447	1,000	1,000	0,967	0,943	0,989	0,921	0,400	0,284	0,863	0,900
	C		0,011	0,046	0,225		0,023			0,149			0,053	0,553				0,034	0,011	0,079	0,600	0,693	0,075	0,100
	F _{IS}	-0,206	-0,012	0,476	0,427	-0,040	-0,035			0,124			-0,056	-0,064			-0,035	-0,045	-0,012	0,276	0,688	0,948	-0,014	-0,111
LDH	B					0,115																		
	C	1,000	1,000	1,000	1,000	0,885	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	F _{IS}					0,372																		

Tab. I-3 (pokračovanie).

Povodie		Odra	Labe												Juž. Čechy	Východné Slovensko									
Lokus	Alela	POLN8	TYN2	SMIR1	CEP1	POH1	VC01	LIB2	PRER	SC11	SC12	SC13	SC14	BL62	VS03	VS01	VS08	VS18	VS16	VS17	VS20	VS09	VS11		
	N	7	18	44	44	40	44	44	20	43	21	39	44	44	43	43	6	30	2	44	12	25	12		
PGM	A			0,131			0,068								0,058			0,033	0,250	0,011	0,542				
	B	0,071	0,469	0,429		0,051	0,091	0,143	0,025	0,151	0,071	0,205	0,034	0,432	0,140			0,050		0,227	0,375	0,100	0,167		
	C	0,143				0,103																			
	D	0,786	0,438	0,214	0,419	0,782	0,614	0,381	0,700	0,605	0,762	0,564	0,489	0,489	0,733	0,907	1,000	0,617	0,750	0,523	0,083	0,500	0,833		
	E		0,094	0,024	0,581	0,064	0,227	0,452	0,275	0,244	0,167	0,231	0,227	0,080	0,070	0,093		0,300		0,239		0,400			
	F			0,202				0,024					0,250												
	F _{IS}	-0,200	0,354	0,097	-0,147	0,516	-0,098	0,092	0,308	0,242	0,261	0,038	0,015	0,120	0,039	-0,103		-0,140	-0,333	0,375	0,255	-0,103	-0,200		
	PGI	A		0,031	0,107		0,063																		
	B					0,013					0,024	0,013	0,148												
	C	0,357	0,250	0,607	1,000	0,838	0,932	0,929	1,000	1,000	0,976	0,962	0,852	1,000	1,000	1,000	1,000	0,950	1,000	0,989	1,000	1,000	0,667		
	D	0,500	0,625	0,286			0,068	0,060				0,026						0,050		0,011			0,333		
	E	0,143	0,094			0,088		0,012																	
	F	0,763	0,767	-0,029		0,129	-0,073	0,807			-0,024	-0,031	0,007					-0,053		-0,012			-0,125		
	F _{IS}																								
MPI	A							0,012																	
	B	0,214	0,167	0,060		0,050	0,046							0,307			0,500								
	C		0,708	0,024							0,048												0,667		
	D	0,643	0,125	0,917	1,000	0,950	0,955	0,952	1,000	1,000	0,952	1,000	1,000	0,693	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,333		
	E	0,143																							
	F							0,036																	
	F _{IS}	0,726	0,267	0,235		1,000	-0,048	-0,040			-0,050			-0,015			1,000						0,625		
AO	A																								
	B		0,188							0,326	0,381	0,256	0,284	0,227	0,257		1,000	0,183	0,500	0,046	0,290	0,020	0,167		
	C	0,143	0,063			0,038				0,674	0,619	0,744		0,102	0,343	1,000		0,400		0,227			0,833		
	D	0,857	0,750	1,000	1,000	0,963	1,000	0,191	1,000				0,716	0,671	0,400			0,417	0,500	0,727	0,708	0,980			
	E							0,810																	
	F	1,000	1,000			0,654		0,228		0,153	0,192	0,193	0,050	0,349	0,304			0,368	-1,000	0,238	-0,008	-0,020	1,000		
	F _{IS}																								
AAT	A		0,094			0,263			0,075	0,174	0,143	0,051	0,205					0,183				0,020			
	B	0,929	0,844	1,000	1,000	0,738	1,000	1,000	0,925	0,733	0,833	0,859	0,716	1,000	1,000	1,000	1,000	0,800	1,000	1,000	1,000	0,980	1,000		
	C	0,071	0,063							0,093	0,024	0,090	0,080					0,017							
	F _{IS}	-0,077	-0,135			0,161			-0,081	0,068	0,163	0,082	0,172					0,512				-0,020			
LDH	B																								
	C	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
	F _{IS}																								

Tab. I-4. Alelické frekvencie a fixačné indexy F_{IS} (Wright, 1965) na skúmaných lokusoch vo všetkých populáciách *D. pulex*

Povodie		Dyje		Morava				Sútok	Odra			Južné Čechy										
Lokus	Alela	JM05	KAN2	STR2	HOR1	KRAL3	ZEB3	SOU15	SUCH1	SUCH2	POLN8	BL61	BL51	JC09	JC01	JC06	JC07	JC08	JC05	JC04	JC02	JC03
	N	2	42	41	44	11	6	39	18	40	39	44	18	12,000	44	42	12	44	42	44	44	44
PGM	A		0,014																			
	B		0,028	0,150	0,023		0,250	0,128	0,056	0,038												
	C										0,051		0,306		0,034	0,012		0,023	0,012	0,114	0,057	0,046
	D	1,000	0,931	0,825	0,977	1,000	0,750	0,821	0,944	0,963	0,949	1,000	0,694	1,000	0,966	0,988	1,000	0,977	0,988	0,886	0,943	0,955
	E		0,028					0,026														
	F			0,025				0,026														
	F _{IS}		-0,050	0,325	-0,023		-0,333	-0,162	-0,059	-0,039	0,473		-0,440		-0,035	-0,012		-0,023	-0,012	-0,128	-0,060	-0,048
PGI	A																					
	B			0,098				0,039		0,950	0,064			1,000								
	C	1,000	0,941	0,902	1,000	1,000	1,000	0,949	1,000	0,050	0,936	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,989	1,000	1,000	1,000	1,000
	D		0,060					0,013										0,011				
	F _{IS}		-0,063	0,446				0,478		-0,053	0,786							-0,012				
MPI	A		0,068																			
	B		0,705	0,122	0,023	0,136		0,128	0,056	0,054	0,103				0,011							0,011
	C		0,227	0,817	0,091	0,091	0,667	0,654	0,833	0,875	0,692	0,898	1,000	0,833	0,727	0,726	0,792	0,739	0,798	0,773	0,784	0,784
	D	1,000		0,061	0,852	0,727	0,250	0,218	0,083	0,071	0,141	0,102		0,167	0,261	0,274	0,208	0,261	0,202	0,227	0,216	0,205
	E				0,034		0,083				0,064											
	F					0,046			0,028													
	F _{IS}		0,289	0,456	0,569	-0,028	0,314	0,244	0,058	0,054	0,262	0,134		0,400	0,266	-0,017	0,242	0,235	-0,106	0,094	0,127	-0,126
AO	A		0,024					0,039														
	B	1,000	0,845	0,793	0,955	0,455	1,000	0,808	1,000	1,000	0,885	1,000	1,000	0,833	1,000	1,000	1,000	0,989	1,000	0,989	0,977	1,000
	C		0,095	0,085	0,046	0,546		0,128			0,115			0,167				0,011		0,011	0,023	
	D		0,036	0,122				0,026														
	F _{IS}		0,827	0,791	1,000	1,000		0,610			0,623			-0,200				-0,012		-0,012	1,000	
AAT	A		0,012	0,049	0,011																	
	B	1,000	0,702	0,927	0,989	1,000	1,000	0,974	1,000	1,000	1,000	1,000	0,944	0,750	0,921	0,762	0,917	0,841	0,833	0,773	0,648	0,796
	C		0,286	0,024				0,026					0,056	0,250	0,080	0,238	0,083	0,159	0,167	0,227	0,352	0,205
	F _{IS}		0,047	0,293	-0,012			-0,026					-0,059	0,556	-0,086	0,213	-0,091	-0,189	0,143	0,353	-0,345	0,162
LDH	A																					
	B		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	C																					
	F _{IS}																					

Tab. I-4 (pokračovanie).

Povodie		Labe					Slovensko												
Lokus	Alela	BEL1	TYN2	SC51	SC52	SC53	TA53	TA54	VS04	VS05	TA51	TA52	VS58	VS13	VS14	VS19	VS07	VS21	VS10
	N	41	36	40	40	7	44	44	44	44	40	44	2	54	36	12	44	10	18
PGM	A																		
	B		0,292											0,009	0,028				
	C					0,143		0,011				0,011		0,343		0,250	0,068		0,056
	D	1,000	0,694	1,000	1,000	0,857	1,000	0,921	1,000	1,000	1,000	0,966	0,500	0,565	0,875	0,583	0,921	1,000	0,861
	E		0,014					0,068				0,023	0,500	0,083	0,097	0,083	0,011		0,083
	F															0,083			
	F _{IS}		-0,028			-0,167		-0,075		-0,012		-0,027	-1,000	0,135	-0,115	0,286	-0,075		0,776
PGI	A							0,023									0,011		
	B		0,181				0,011		0,080	0,011			0,250				0,023		0,028
	C	1,000	0,806	1,000	1,000	1,000	0,989	0,966	0,921	0,989	1,000	1,000	0,500	1,000	0,958	1,000	0,966	1,000	0,972
	D		0,014					0,011					0,250		0,042				
	F _{IS}		0,826				-0,012	-0,027	0,224	-0,073			0,200		0,652		-0,027		-0,029
MPI	A											0,034						0,050	
	B	0,061	0,069	0,025		0,071	0,011				1,000	0,966		0,046	0,181		0,011		
	C	0,902	0,750	0,488	0,363	0,714	0,989	1,000		0,932				0,898	0,769	0,833	0,989	0,950	1,000
	D	0,037	0,181	0,488	0,638	0,071				0,068				0,056	0,056	0,167			
	E					0,143													
	F																		
	F _{IS}	0,190	0,653	-0,097	0,189	0,067	-0,115		1,000	1,000		-0,035	1,000	-0,083	0,344	0,400	-0,012	-0,053	
AO	A																		
	B	0,927	0,861	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000		0,694	0,955	0,667	0,361	0,650	1,000
	C	0,073	0,056							0,500				0,306		0,292	0,640		
	D		0,083												0,046	0,042		0,350	
	F _{IS}	1,000	1,000										1,000	0,782	0,651	0,467	0,647	-0,539	-0,029
AAT	A	0,012	0,056			0,286										0,083			
	B	0,988	0,889	1,000	1,000	0,714	1,000	1,000	1,000	1,000		0,932	1,000	1,000	1,000	0,917	1,000	1,000	0,972
	C		0,056									0,068							0,028
	F _{IS}	-0,012	0,182			-0,400					1,000	0,285				-0,091			
LDH	A										0,013								
	B	1,000	0,970	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,988	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	C		0,303																
	F _{IS}		-0,012								-0,013								